

ADENYLATZYKLASEAKTIVITÄT, 3', 5' - AMP
UND LIPOLYSE ISOLIERTER FETTZELLEN
DER RATTE UNTER DEM EINFLUSS VON
LOKALANAESTHETIKA UND CALCIUM-IONEN

Franz Rinninger

—

1980

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77

Aus dem Institut für Diabetesforschung München

Vorstand: Prof. Dr. H. Mehnert

Prof. Dr. O. Wieland

Adenylatzyklaseaktivität, 3',5'-AMP
und Lipolyse isolierter Fettzellen
der Ratte unter dem Einfluß von Lo-
kalanaesthetika und Calcium-Ionen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin

an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Franz Rinninger

aus Kißlegg im Allgäu

München 1980

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. K. D. Hepp

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Mehnert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Mai 1980



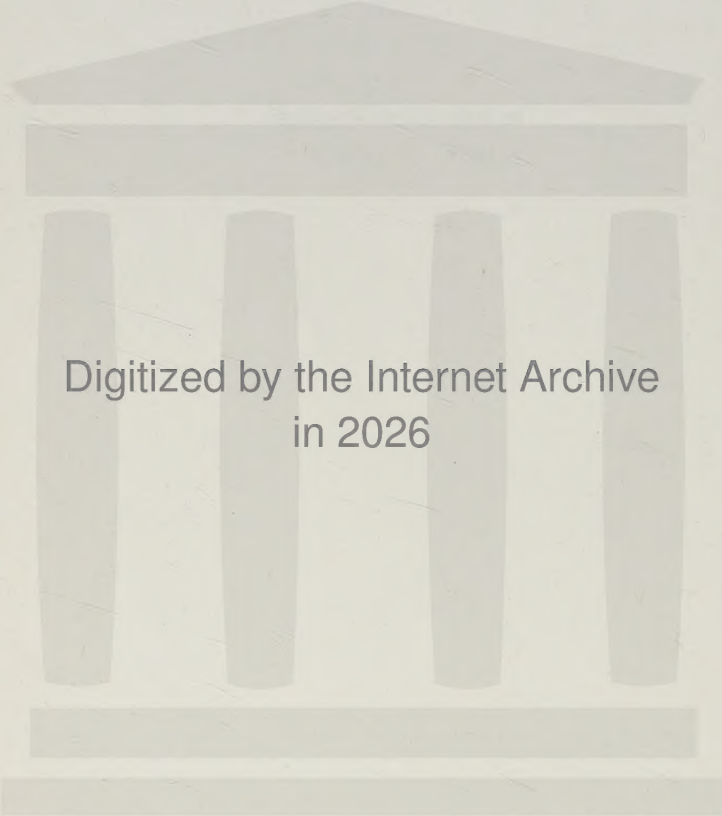
Herrn Prof. Dr. K. D. Hepp danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit. Unter seiner Leitung habe ich sie am Institut für Diabetesforschung ausgeführt. Prof. Hepp hat mich fortwährend unterstützt, insbesondere durch Kritik und Diskussion bei der Auswertung und Niederschrift vorliegender Ergebnisse.

Herrn Dr. H. U. Häring und Herrn Dr. R. Renner danke ich für ihre Unterstützung in sämtlichen methodischen Problemen. Besonders bei der Durchführung der Versuche, aber auch durch zahlreiche kritische Anregungen, waren sie mir eine wertvolle Hilfe.

Frau R. Anding danke ich für ihre perfekte technische Hilfe.

Meinem Vater gewidmet

(1917 - 1979)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548319_0082

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Abkürzungen</u>	5
3. <u>Methoden und Materialien</u>	6
3.1. Materialien und Geräte	6
3.2. Präparation isolierter Fettzellen der Ratte	10
3.3. Inkubation der Fettzellen	11
3.4. Aufbereitung von cAMP	12
3.5. Die cAMP-Bestimmung	13
3.6. Glycerinbestimmung	14
3.7. Untersuchung der Adenylatzyklase	14
3.8. Präparation von Fettzell-Ghosts	17
3.9. Präparation von Fettzell-Membranen	18
3.10. Adenylatzyklase-Assay	19
4. <u>Einfluß der Inkubationsbedingungen auf cAMP und Lipolyse</u>	21
4.1. Katecholamin- und Insulinwirkung auf cAMP und Lipolyse	21
4.2. Wirkung von Adenosin-Desaminase auf die cAMP-Spiegel	27
4.3. Einfluß der Zellkonzentration auf die cAMP-Spiegel	28
5. <u>Bedeutung extrazellulärer Calcium-Ionen bei der Regulation von cAMP-Spiegeln und Lipolyse</u>	34
6. <u>Einfluß von Lokalanaesthetika auf die Lipolyserate, Adenylatzyklase-Aktivität und die cAMP-Spiegel des Fettgewebes</u>	41
6.1. Wirkung von Lokalanaesthetika auf die Lipolyse	42
6.2. Wirkung von Lokalanaesthetika auf die Adenylatzyklase	43
6.3. Wirkung von Lokalanaesthetika auf die cAMP-Spiegel	52

	<u>Seite</u>
7. <u>Bedeutung extrazellulärer Calcium-Ionen bei der Wirkung von Lokalanaesthetika</u>	57
8. <u>Diskussion</u>	62
8.1. Kompartimentierung von cAMP	62
8.2. Tetracain- und Insulinwirkung auf die Adenylatzyklase	63
8.3. Lokalanaesthetika und die cAMP-Spiegel	66
8.4. Lokalanaesthetika und die Lipolyse	68
8.5. Extrazelluläre Calcium-Ionen und die Regulation der Lipolyse	69
8.6. Insulin und Lokalanaesthetika: Gemeinsamer oder getrennter Rezeptor	71
8.7. Lokalanaesthetika und das Fettgewebe	71
8.8. Calcium und Fettzellenzyme	72
8.9. Modell der Lipolysehemmung durch Calcium	74
8.10. Hypothese: cAMP und Calcium gemeinsam als 'second messenger' der Lipolyseregulation	77
9. <u>Zusammenfassung</u>	79
10. <u>Literaturverzeichnis</u>	80
11. <u>Lebenslauf</u>	86

1. Einleitung

Das Säugetierfettgewebe speichert hormonabhängig Triglyceride als Energiereserve und stellt diese bei Bedarf dem Organismus wieder zur Verfügung (30). Die isolierte Fettzelle der Ratte ist ein häufig verwendetes Modell für das Studium der hormonellen Regulation der Lipolyse (63). Hormone wie die Katecholamine, ACTH, MSH, TSH, Vasopressin und Glukagon steigern die Lipolyse; Insulin ist der einzige physiologische Antagonist mit lipolysehemmender Wirkung (30).

In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, daß lipolytische Hormone die Adenylatzyklase der Fettzellmembran aktivieren und dadurch aus ATP vermehrt der 'second messenger' cAMP entsteht. Dieses stimuliert eine Proteinkinase, die die inaktive Triglyceridlipase in die aktive Form überführt (Abb. 1.1.). Letztere ist ratenlimitierend für den Triglyceridabbau (7, 37).

Während die kausale Bedeutung des cAMP-Anstiegs im Mechanismus der Lipolyseaktivierung durch lipolytische Hormone heute weitgehend akzeptiert wird (61, 72), ist dagegen unklar, über welchen intrazellulären Mechanismus die lipolysehemmende Insulinwirkung vermittelt wird.

BUTCHER et. al. (6) beobachteten als erste in isolierten Fettzellen einen Abfall Katecholamin-stimulierter cAMP-Spiegel parallel zur Hemmung der Lipolyse durch Insulin. Daraus wurde geschlossen, daß der antilipolytische Insulineffekt durch die cAMP-Senkung übertragen wird. Verschiedene Studien (z. B. 10) bestätigten zwar dieses Konzept, andere aber fanden keinen Abfall stimulierter cAMP-Spiegel durch Insulin oder nur eine ungenügende Korrelation zwischen cAMP-Erniedrigung und Lipolysehemmung (19, 70). Die Bedeutung des zyklischen Nucleotids als 'second messenger' der Insulinwirkung an der Fettzelle ist deshalb bis heute nicht unumstritten.

In neueren Untersuchungen wurden alternative Kandidaten als 'second messenger' des Insulins diskutiert. Nach Insulinapplikation beobachteten ILLIANO et. al. (38) und FAIN und BUTCHER (17) einen Anstieg des in sehr niedriger Konzentration in der isolierten Fettzelle vorkommenden zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP).

Katecholamine führten jedoch ebenfalls zu einer Erhöhung der cGMP-Spiegel (17). Infolgedessen wurde bezweifelt, ob cGMP als Vermittler der Insulinwirkung fungiert.

Ein weiterer Kandidat für die Insulin-Signal-Übertragung ist Calcium. Insulin erhöht die zytoplasmatischen Calcium-Spiegel (8). Calcium verändert die Aktivität mehrerer durch Insulin regulierter Fettzellenzyme, z. B. der Proteinkinase (45), Phosphatase (n) (45), Pyruvatdehydrogenase (69). KISSEBAH et. al. (43) haben deswegen eine zentrale Funktion des Calciums als 'second messenger' des Insulins postuliert. Zentraler Vorgang wäre eine durch Insulin hervorgerufene Erhöhung der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration.

Weiter unterstützt wird diese Theorie durch die Wirkungen von Lokalanaesthetika auf die Fettzelle. Diese interferieren mit zellulären Ionenverschiebungen (59), besonders der von Calcium (3). Wie Insulin hemmen sie an der isolierten Fettzelle die Lipolyse (44, 71), haben jedoch uneinheitliche, von Insulin abweichende Wirkungen auf die cAMP-Spiegel (44, 71). Diese Daten unterstützen die Hypothese, daß Calcium der intrazelluläre Bote für die antilipolytische Wirkung von Insulin und Lokalanaesthetika ist, und Veränderungen der cAMP-Spiegel von untergeordneter Bedeutung sind.

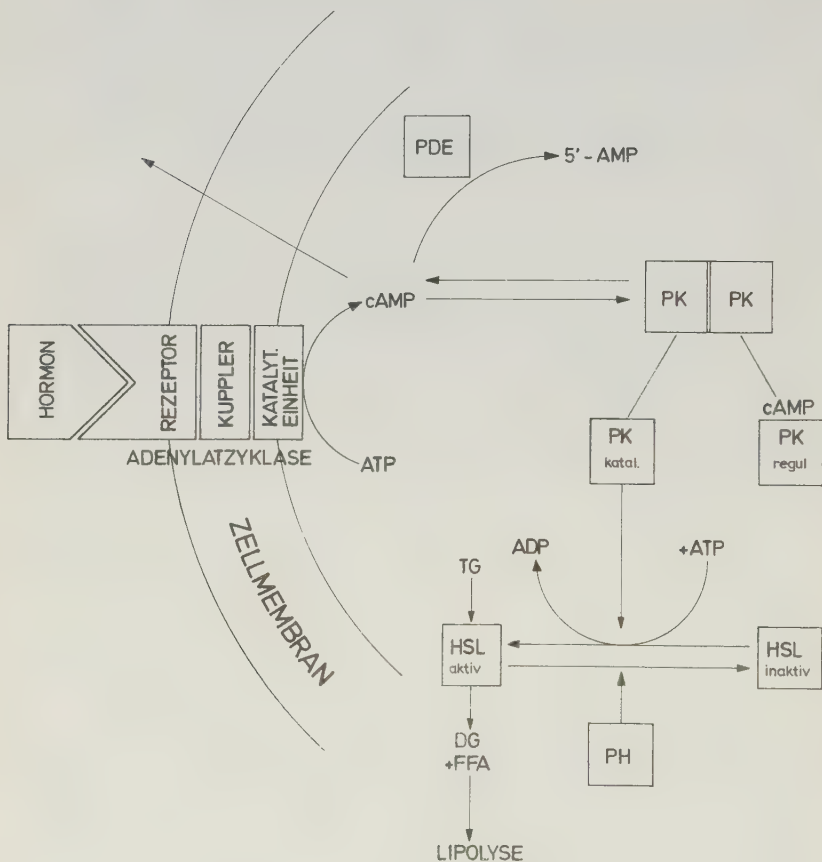
Zielsetzung dieser Arbeit

Zur Charakterisierung des Versuchssystems dieser Arbeit wurde zunächst die Katecholamin- und die Insulinwirkung auf die cAMP-Spiegel und Lipolyseraten isolierter Fettzellen der Ratte untersucht. Aufgrund der erwähnten Diskussion über die Bedeutung der Calcium-Ionen in der Lipolysereregulation sollte besonders berücksichtigt werden, ob die Wirkung beider Hormone durch extrazelluläre Calcium-Ionen modifiziert wird.

Der Fettzellmetabolit Adenosin (67) und die Zellkonzentration im Inkubationsmedium (67) sollen die Höhe der cAMP-Spiegel in der Fettzelle beeinflussen. Deshalb wurde der Einfluß beider Effekte auf unser Testsystem überprüft.

Weiterhin wurde die Lokalanaesthetikawirkung auf die Fettzelle eingehend untersucht. Ihre Wirkung auf die Lipolyse und die cAMP-Spiegel, auch in Gegenwart des Phosphodiesterase-Hemmstoffs IBMX, sollte mit der Insulinwirkung sowie Daten aus der Literatur (44, 71) verglichen werden. Da Lokalanaesthetika mit der zellulären Calcium-Verteilung (59) interferieren, ermöglichen sie indirekt das Studium der Bedeutung dieser Kationen in der Lipolyse-Regulation. Außerdem wurde getestet, ob ihre Wirkung auf die Fettzelle von extrazellulären Calcium-Ionen abhängig ist.

Die Hemmung der Adenylatzyklase durch Insulin steht in ursächlichem Zusammenhang zur Lipolysehemmung (58). Weil Lokalanaesthetika wie Insulin antilipolytisch wirksam sind und außerdem die Adenylatzyklase von Rattenherzen hemmen (12), wurde die Tetra-cainwirkung auf die Fettzelladenylatzyklase im zellfreien Versuchssystem untersucht. Parallele, hemmende Wirkungen von Lokalanaesthetika und Insulin auf die Adenylatzyklase würden die kausale Bedeutung der Adenylatzyklasehemmung für die Antilipolyse weiter unterstützen.

Wirkungsmechanismus eines lipolytischen HormonsAbkürzungen:

DG	Diglyceride
FFA	Freie Fettsäuren
HSL	Hormonsensitive Lipase
PDE	Phosphodiesterase
PH	Phosphatase (n)
PK	Proteinkinase
TG	Triglyceride

2. Verwendete Abkürzungen

ADA	Adenosin-Desaminase
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
cAMP	cyclo-AMP 3',5'-AMP Adenosin-3',5'-cyclisches Monophosphat
cGMP	Guanosin-3',5'-cyclisches Monophosphat
dB-cAMP	Dibutyryl-cAMP Dibutyryl-adenosin-3',5'-Monophosphat cyclisch
EGTA	Ethyleneglycolbisamintetraacetic acid
HEPES	Hydroxyäthylpiperazinäthansulfonsäure
IBMX	Isobutyl-Methylxanthin
Iso	Isoproterenol
TRIS	Tris- (hydroxymethyl) -aminomethan

3. Methoden und Materialien

3.1. Materialien und Geräte

Albumin:	- Humanalbumin, SCHWEIZER ROTES KREUZ, Bern Vor Gebrauch dialysiert - Serumalbumin vom Rind, trocken, reinst, elektrophoretischer Reinheitsgrad 100 % BEHRING Werke, Marburg Vor Gebrauch dialysiert
Aluminiumoxid:	Al_2O_3 W 200 neutral Firma WOELM, Eschwege
Aluminiumsäule:	Siehe Anhang
ATP:	Adenosin-5'-Triphosphat, BOEHRINGER, Mannheim
(α ³² P) ATP:	(α ³² P) Adenosin-5'-Triphosphat, 1 mCurie/ml, AMERSHAM, Braunschweig
cAMP:	3',5'-AMP, BOEHRINGER, Mannheim
(³ H) cAMP:	(8. ³ H) Adenosin 3',5'-cyclic phosphate spezifische Aktivität ca. 5 μCi in 180 pmol
Carbogen:	95 Vol% O_2 / 5 Vol% CO_2 LINDE, Aktiengesellschaft, München
Creatinphosphat:	BOEHRINGER, Mannheim
Creatin-Phosphokinase:	BOEHRINGER, Mannheim
cyclic AMP assay kit,	Code TRK 432, von 'THE RADIOCHEMICAL CENTRE AMERSHAM', Braunschweig. Bestandteile:
	- TRIS/EDTA Puffer (50 mM TRIS/HCL, 4 mM EDTA, pH 7,5) - Bindungsprotein vom Rinderskelettmuskel - (8- ³ H) Adenosin 3',5'-Phosphat, zyklisch ca. 5 μCi - Adenosin 3',5'-Phosphat, zyklisch, Standard 1600 pmol - Charcoal adsorbent
Diäthyläther:	Qualität: p.a., MERCK, Darmstadt
dB cAMP:	Dibutyryl-cAMP, $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_8\text{P Na}$, MG.: 491,39 N^6 -2' ⁰ - Dibutyryl-adenosin-3',5'- Monophosphat, zyklisch BOEHRINGER, Mannheim
Dextran:	Polysaccharid, MG.: 500 000, PHARMACIA, Uppsala, Schweden
DOWEX:	Ionenaustauschharz, 50 WX 4, mesh 200 - 400 SERVA, Heidelberg
Dowexsäule:	Siehe Anhang
Dodecylhydrogensulfat,	Natriumsalz: MG.: 288,38 $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$, MERCK, Darmstadt

- PGTA: Ethyleneglycol-bis-(γ -Amino-Ethyl-Ether)-
N, N'- Tetra-Aceticacid, Anhydrous, MG.: 380,4
SIGMA CHEMICAL COMPANY, St. Louis, U.S.A.
- Eppendorf-Cups: EPPENDORF Reaktionsgefäße, 1,5 ml, Best.-Nr. 3810
EPPENDORF Gerätebau, Hamburg
- Glassäulen: Abmessung: 0,4 x 15 cm, BENDER und HOBEIN, München
- Glucose: D(+)-Glucose, wasserfrei, $C_6H_{12}O_6$, p.a.
E. MERCK, Darmstadt
- HEPES: N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure
 $C_8H_{18}O_4N_2S$, MG.: 238,3
SERVA, Heidelberg
- Homogenisator: Ultraschallhomogenisator, BRAUN, Sonic 125
- IBMX: 3-Isobutyl-1-methylxanthin (reinst), $C_{10}H_{15}N_4O_2$
MG.: 245,3, SERVA, Heidelberg
- Imidazol: $C_3H_4N_2$, MG.: 68,1
SERVA, Heidelberg
- Inkubationswanne: KÖTTERMANN
- Insulin: Krist. Rinderinsulin, monocomponent, NOVO,
Kopenhagen, Dänemark
- Isoproterenol: DL-Isopropylarterenol-HCl (pharm.), $C_{11}H_{17}NO_3 \cdot HCl$
MG.: 247,7
SERVA, Heidelberg
- Kollagenase: - Kollagenase 150 U/mg, CLS II 43 N 114
- Kollagenase 153 U/mg, CLS 47 B 177 P
beide von
WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION,
Freehold, New Jersey, U.S.A.
- KREBS-RINGER-HEPES-Puffer: nach GLIEMANN (25)
- | | |
|---|-------------------|
| NaCl | 121,4 mM (131 mM) |
| KCl | 4,8 mM |
| CaCl ₂ | 2,5 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,2 mM |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 1,2 mM |
| HEPES | 25,0 mM |
| Glucose | 10,0 mg% |
| Albumin (Kollag.Inkub.) | 5,0 g% |
| oder | |
| Albumin (Zellinkubat.) | 2,5 g% |
| pH Korrektur mit 10 M NaOH auf pH 7,4, ca. 0,1 ml | |
| dadurch Na ⁺ | 131,0 mM |
- Lyophilisator: WKF L 05 S
WKF Forschungsgeräte Darmstadt

Lysing-Medium für die Präparation von Ghosts:

ATP-TRIS	2,5 mM
MgCl ₂	2,5 mM
CaCl ₂	0,1 mM
KHCO ₃	1,0 mM
TRIS-HCl	2,0 mM
pH 7,4	

Magnetrührer:	CENCO Instruments
Millipore-Filterspritze:	Bestellnummer XX30-01200, MILLIPORE
NaF:	Natriumfluorid, MERCK, Darmstadt
Noradrenalin:	SERVA, Heidelberg
Pantocain-HCl:	Substrat, MG.: 300,8, HOECHST, Frankfurt/Main
Photometer:	EPPENDORF Gerätebau, Hamburg
Pipetten:	EPPENDORF Gerätebau, Hamburg
pH Meßgerät, elektrisch:	PUSL, München
Ratten:	WISTAR, EGON JAUTZ, 7964 Kiblegg/Allgäu
Reagenzgläser:	Polystrol-Kunststoff, Abmessungen 12 x 100 mm und 20 x 100 mm
Scintillationsflüssigkeit:	Scintigel ROTH C. ROTH KG, Karlsruhe
Scintillationszähler:	MARK II Liquid Scintillation System G. D. SEARLE, Nuclear Chicago Division
Sucrose:	= D(+) Saccharose, C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ , MG.: 342,30 E. MERCK, Darmstadt
Tetracain-HCl:	siehe Pantocain-HCl
Trichloressigsäure	E. MERCK, Darmstadt
TRIS:	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, zur Analyse C ₄ H ₁₁ NO ₃ , E. MERCK, Darmstadt
TRIS I - Puffer:	Nach HEPTNER und CHRIST (34) NaCl 5,1 g K ₂ HPO ₄ ·3 H ₂ O 1,94 g TRIS 2,40 g zusammen ad 500 ml aqua bidest. pH Korrektur mit konzent. HCl pH 8,0 ad Albuminlösung 10 g% 500 ml (also 5 g% Albumin) Glucose 10 mg%
TRIS II - Puffer:	Nach HEPTNER und CHRIST (34) NaCl 3,50 g K ₂ HPO ₄ ·3 H ₂ O 1,94 g TRIS 2,40 g Glucose 0,10 g zusammen ad 500 ml aqua bidest. pH Korrektur mit konzent. HCl pH 7,2 + H ₂ O 250 ml + Albuminlösung 10 g% 250 ml
Zentrifugen:	- BECKMAN Ultrazentrifuge, Typ L 2-50 - EPPENDORF Tischzentrifuge, Typ 3200 - Hettich, Typ 'Rotixa' - SORVALL, Typ Superspeed RC 20 - SORVALL, Typ Superspeed RC 2 B

3.1. Materialien und Geräte, Anhang

ALUMINIUM-Säulen:

0,6 g neutrales Al_2O_3 pH 7,5 wird in 8 ml 0,1 M Imidazol gewaschen und anschließend in jede Glassäule 0,4 x 15 cm gegeben. Damit keine Luftblasen entstehen, läßt man die Suspension in der Säule an einem Stab hinunterlaufen; diesen sofort entfernen. Die Säulen dürfen trockenlaufen.

Regenerieren: 8 ml 0,1 M Imidazol pH 7,5 in jede Säule pipettieren und durchlaufen lassen. Danach kann die Säule sofort wieder benützt werden. Höchstens zehnmal wiederholen.

Anmerkung: Die Aluminium-Säule ist pH empfindlich. Das Eluat aus der DOWEX-Säule soll pH 7,5 haben.

DOWEX-Säulen:

200 g DOWEX A.G. 50 W.X. 4 mesh 200-400 wird mit 1 l aqua bidest. versetzt und 20 Min. gerührt. Man läßt die Suspension sedimentieren, der Überstand wird verworfen.

Diese Prozedur wird sechsmal wiederholt, der pH-Wert des Überstandes soll pH 3 - 4 betragen.

Glas-Säulen 0,4 x 15 cm. Ein kleiner Polystyrene-Zylinder (Schaumstoff-Karteilocher) wird als Filter für die Säule verwendet. 1 ml H_2O wird gleichzeitig mit 1 ml DOWEX-Lösung in die Säulen pipettiert. Die DOWEX-Säule soll etwa 3,3 cm Höhe haben.

Die Säule darf niemals trockenlaufen; sie wird nur einmal verwendet.

3.2. Präparation isolierter Rattenfettzellen

Isolierte Fettzellen wurden nach der Methode von ROBBELL (63) präpariert. Standard-Inkubationsmedium war ein TRIS-Albumin-Puffersystem nach HEPTNER + CHRIST (34), als Calcium-Ionen enthaltendes Milieu wurde KREBS-RINGER-HEPES-Albumin-Puffer nach GLIEMANN (25) verwendet.

a) Präparation in Ca^{++} -freiem TRIS-Albumin-Puffer

Männliche WISTAR-Ratten (130 - 160 Gramm) mit freiem Zugang zu Futter und Wasser wurden dekapitiert, das epididymale Fettgewebe entnommen und in 2 bis 3 Stücke zerschnitten. Isoliert wurden die Zellen aus 3 bis 5 Gramm Fettgewebe in Kunststoff-Fläschchen mit 8 mg Kollagenase und 4 ml TRIS I - Puffer (5 g% Albumin, 10 mg% Glucose, pH 8,0). Vor Beginn der Inkubation wurde das pH der Fettgewebssuspension durch Begasen mit CARBOGEN auf pH 7,5 eingestellt und die Atmosphäre im Fläschchen mit CARBOGEN begast. Inkubiert wurde 55 Minuten im Wasserbad bei einer Schüttelfrequenz von 120/Minute und 37 °C.

Nach der Inkubation wurde die Suspension mit 10 ml TRIS II (2,5 g% Albumin, 10 mg% Glucose, pH 7,2, 37 °C) verdünnt und durch gereinigtes Nylongewebe gefiltert, um Fettzellen und Bindegewebsteilchen voneinander zu trennen. Anschließend wurde die homogene Fettzellsuspension in einer HETTICH-Zentrifuge mit ca. 500 upm zentrifugiert; zur Trennung von Kollagenase-haltigem Medium (unten) und Zellen (Überstand) wurde der Unterstand mit einer Spritze abgesaugt. Zur restlosen Entfernung der Kollagenase wurde dieser Vorgang viermal wiederholt mit je 10 ml TRIS II - Puffer (37 °C). Zum Schluß wurden die "gepackten Zellen" mit TRIS II - Albumin-Puffer (2,5 g% Albumin, 10 mg% Glucose, pH 7,2) auf die gewünschte Zellkonzentration verdünnt.

b) Präparation isolierter Fettzellen in Ca^{++} -haltigem KREBS-RINGER-HEPES-Albumin-Puffer

Bei der Präparation von isolierten Fettzellen im KREBS-RINGER-HEPES-Puffersystem wurde prinzipiell wie oben verfahren, lediglich wurde statt TRIS I KREBS-RINGER-HEPES-Albumin-Puffer

(5 g% Albumin, 10 mg% Glucose, pH 8,0) und statt TRIS II das KREBS-RINGER-HEPES-Albumin-Puffersystem (2,5 g% Albumin, 10 mg% Glucose, pH 7,4) verwendet.

3.3. Inkubation der Zellen mit Hormonen und sonstigen Substanzen

Die Wirkung von Hormonen und sonstigen Substanzen auf cAMP-Spiegel und Lipolyse isolierter Fettzellen wurde mit den folgenden Inkubationsmethoden untersucht.

a) Methode I: Inkubation in Einzelproben für die cAMP-Bestimmung

Dieses Verfahren fand zur Aufstellung von cAMP-Dosiswirkungskurven und cAMP-Kinetiken in Zeitintervallen von mehr als 0,5 Minuten Verwendung.

Die mit TRIS II (K.-R.-HEPES)-Puffer auf eine Zellkonzentration von 120 000 bis 160 000 Zellen/ml (Endkonzentration) verdünnte Zellsuspension wird mit einem Magnetrührer im Wasserbad (37 °C) schonend gerührt. Je 1 ml Suspension wird zeitlich versetzt daraus entnommen und zur Inkubation in 1,5 ml Medium, Hormone und sonstige Zusätze enthaltende Kunststoffröhrchen gegeben. Nur bei Verwendung von TRIS II-Albumin-Puffer wurde das pH mit konzentrierter NaHCO_3 -Lösung auf pH 7,4 eingestellt. Insgesamt also 2,5 ml Inkubationsvolumen. Nach Verschluss der Kunststoffröhrchen wurde 0,5 bis 5 Minuten lang im Wasserbad (37 °C) mit einer Schüttelfrequenz von 200/Minute inkubiert. Beendet wurde die Inkubation durch Umkippen der Zellsuspension in 0,5 ml eisgekühlte Trichloroessigsäure (30 g%) enthaltende Zentrifugenröhrchen. TCA Endkonzentration 5 g%.

b) Methode II: Inkubation in Einzelproben zur Lipolysebestimmung

Als Maß für die Lipolyse wurde die Glycerinfreisetzung bestimmt. Aus der mit TRIS II- oder K.-R.-HEPES-Puffer verdünnten und im Wasserbad bei 37°C warmgestellten Fettzellsuspension wurden jeweils 1 ml entnommen und zur Inkubation in je 1,5 ml Puffer, Hormone und sonstige Zusätze enthaltende Kunststoffröhrchen gegeben. Nur bei Verwendung von TRIS II-Albumin-Puffer wurde das pH mit konzentrierter NaHCO_3 -Lösung auf pH 7,4 eingestellt. Nach

Verschuß der Röhrchen wurde 60 Minuten im Wasserbad (37°C) mit einer Schüttelfrequenz von 120/Minute inkubiert. Beendigung der Reaktion durch Abkühlen der Proben mit Eis. Glycerin enthaltendes Medium und Zellen wurden durch gereinigte Papierfilter voneinander getrennt.

c) Methode III: Inkubation im "Pool" zur Bestimmung der
cAMP-Anfangskinetik

Zur Bestimmung der cAMP-Anfangskinetik mit sehr kurzen Intervallen fand folgende Methode Verwendung:

Eine auf 120 000 bis 160 000 Zellen/ml mit TRIS II- oder K.-R.-HEPES-Puffer verdünnte Fettzellsuspension wurde in einem offenen Kunststoffgefäß im Wasserbad (37°C) mit einem Magnetrührer schonend gerührt. Nach 3 Minuten Äquilibrationszeit und pH-Korrektur wurde die Inkubation durch Hormonzugabe gestartet. In Intervallen von 10 bis 30 Sekunden wurden 2,5 ml Fettzellsuspension entnommen und die Inkubation der Probe durch 0,5 ml eisgekühlte Trichloressigsäure (30 g%) beendet. TCA Endkonzentration 5 g%.

d) Bestimmung der Zellzahl

Aus der Fettzellsuspension von 3.3. a), b) oder c) wurden Proben entnommen und 1 : 10 verdünnt. 5 μl dieser verdünnten Suspension wurden auf einen Raster-Objektträger aufgetragen und die genaue Zellzahl im Lichtmikroskop bestimmt. Anschließend Multiplikation des Ergebnisses mit entsprechenden Umrechnungsfaktoren.

3.4. Aufbereitung von cAMP (66)

Nach Fällung der Fettzellsuspension mit Trichloressigsäure wurde jede Probe durch 20 Sekunden Ultraschallbehandlung (BRAUN Sonic 125, Stufe 80) homogenisiert. Nach 5 Minuten Zentrifugation mit 40 000 x g (SORVALL) wurden 2 ml vom klaren Überstand abgenommen. Die Trichloressigsäure wurde unter Zusatz von 0,1 ml 1 N HCl durch 5-maliges Ausschütteln mit 7-fachem Volumen wassergesättigtem Diäthyläther entfernt. Nach Neutralisation mit 1 N NaOH wurden die Proben eingefroren und gefriergetrocknet (WKF). Lösen des

Trockenpulvers in 0,15 bis 2,0 ml TRIS-EDTA-HCl Puffer (50 mM TRIS/HCl, 4 mM EDTA, pH 7,5) aus dem cyclic AMP assay kit. Das pH jeder Probe wurde kontrolliert und bei Bedarf korrigiert (pH 7,5).

3.5. Die cAMP-Bestimmung

Zur cAMP-Bestimmung wurde ein von GILMAN (23) und anderen Autoren (5, 15, 75) beschriebener, handelsüblicher cAMP-Protein-Bindungs-Assay verwendet. Diese Methode zeichnet sich durch hohe Spezifität gegenüber cAMP und einem Minimum an Kreuzreaktionen mit anderen Nucleotiden und Proteinen (75) aus. Gegenüber älteren Verfahren wurde die Meßgenauigkeit wesentlich verbessert.

Das Prinzip dieses Assay's beruht auf der Konkurrenz von (^3H) markiertem cAMP und unmarkiertem cAMP um die spezifischen Bindungsstellen einer aus Rinderskelettmuskel (22) präparierten Proteinkinase. Allen Proben in gleicher Menge zugegebenes (^3H) cAMP wird entsprechend dem unmarkierten cAMP-Gehalt der Testproben von den Bindungsstellen der Proteinkinase verdrängt. Nach einer Äquilibrationsphase wird *f r e i e s* , markiertes und unmarkiertes cAMP durch Adsorption an Kohle vom an den Proteinkomplex *g e b u n d e n e n* cAMP getrennt. Die an den cAMP-Proteinkinase-Komplex gebundene Radioaktivität wird gezählt und die cAMP-Menge einer Testprobe an einer parallel aufgestellten Eichkurve abgelesen.

a) Durchführung der cAMP-Bestimmung

Für die cAMP-Bestimmung wurde ein auf obigem Prinzip beruhender 'cyclic AMP assay' von 'THE RADIOCHEMICAL CENTRE AMERSHAM' (75) (siehe auch Abschnitt 3.1., Materialien und Geräte) verwendet.

Die cAMP-Extrakte aus Fettzellhomogenaten wurden mit TRIS-EDTA-HCl-Puffer (50 mM TRIS/HCl, 4 mM EDTA, pH 7,5) so verdünnt, daß sie nach Möglichkeit im idealen Meßbereich des Assays lagen. Die verschiedenen Lösungen wurden in den in Tabelle 3.1. angegebenen Mengen in eisgekühlte 'EPPENDORF-Cups' à 1,5 ml pipettiert. Zuletzt wurde durch Bindungsproteinzugabe und 5 Sekunden Schütteln

die Reaktion gestartet. Inkubiert wurden die Proben 2 Stunden bei 2 - 4 °C im Kühlschrank. Danach, zur Trennung des ungebundenen cAMP vom an die Proteinkinase gebundenen, wurden 0,1 ml eiskühler Kohlesuspension den 0,2 ml Lösung enthaltenden Proben zugegeben, 10 Sekunden geschüttelt und unmittelbar anschließend in einer gekühlten 'EPPENDORF-Zentrifuge' zentrifugiert. 0,2 ml Überstand wurden in 10 ml Scintillations-Flüssigkeit (ROTH) überführt und die Radioaktivität im Scintillationszähler (MARK II) gemessen.

Tabelle 3.2. zeigt ein typisches Zählergebnis für eine Eichkurve und die dazugehörige Umrechnung, Abbildung 3.1. die nach Tabelle 3.2. berechnete Eichkurve, an welcher die Meßwerte der Testproben abgelesen wurden.

3.6. Glycerinbestimmung

Die Glycerinkonzentration im Medium wurde nach der von EGGSTEIN et. al. (14) beschriebenen enzymatischen Methode gemessen.

3.7. Untersuchung der Adenylatzyklase

In der intakten Fettzelle katalysiert das durch verschiedene Hormone stimulierbare Adenylatzyklase-System die Bildung von cAMP aus ATP. Es nimmt somit eine Schlüsselrolle im intrazellulären cAMP-Umsatz ein.

Studienmodelle der Adenylatzyklase sind zellfreie Versuchssysteme, Fettzell-Ghosts wurden von BIRNBAUMER et. al. (2) beschrieben, Fettzell-Plasmamembran-Präparationen von AVRUCH et. al. (1). Die in beiden enthaltende Adenylatzyklase-Aktivität wird in einem hochempfindlichen Versuchssystem getestet (SALOMON et. al., 64). Darin erhöhen verschiedene Hormone und Substanzen wie Katecholamine, ACTH und Natriumfluorid ihre Aktivität, Insulin entfaltet eine antagonistische Wirkung.

Tabelle 3.1.

Pipettierschema des 'cyclic AMP assay' von "The Radiochemical Centre Amersham"

Angegebene Mengen in μl

Probe-Nr.	Leerwert		A_0 (C_0) Standard										Testprobe 1 usw.			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 pmol cAMP					50	50										
2 pmol cAMP							50	50								
4 pmol cAMP									50	50						
8 pmol cAMP											50	50				
16 pmol cAMP													50	50		
Testprobe 1															50	50
usw.																
Cyclic (^3H)AMP	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Puffer	150	150	50	50												
Bindungsprotein			100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tabelle 3.2.

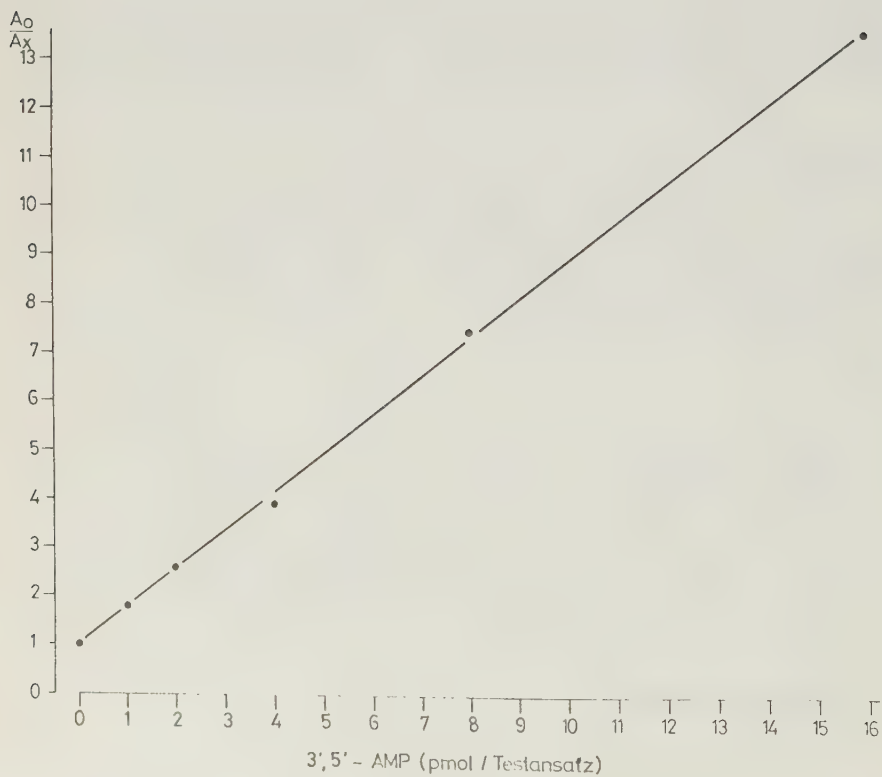
Zählergebnis einer Eichkurve mit Umrechnung

Cup	cpm Leerwert des Gerätes abgezogen	Mittelwert cpm	Mittelwert cpm - Leerwert	Co/Cx	cAMP pmol/Cup Standard
1	90				
2	83	87	-	-	-
3	5095	5088	5001	1,0	0
4	5081				
5	2908	2911	2824	1,77	1,0
6	2914				
7	1993	2000	1913	2,61	2,0
8	2007				
9	1362	1374	1287	3,89	4,0
10	1385				
11	756	763	676	7,40	8,0
12	770				
13	486	460	373	13,41	16,0
14	434				

Abbildung 3.1.

Eichkurve für die cAMP-Bestimmung

Gezeichnet nach Tabelle 3.2.



3.8. Präparation von Fettzell-Ghosts

Fettzell-Ghosts sind durch osmotische Lysis aus isolierten Fettzellen gewonnene sphärische, intakte Plasmamembranpartikel. Sie wurden in dieser Arbeit nach folgender, von BIRNBAUMER et. al. (2) beschriebenen Methode hergestellt:

Für die Präparation von Ghosts wurden isolierte Fettzellen verwendet; diese wurden, wie in Abschnitt 3.2. beschrieben, für jede Versuchsreihe frisch vorbereitet. Nach dem Abkühlen der gepackten Zellen auf 0 °C im Zentrifugenröhrchen wurde die Suspension zum Auswaschen des restlichen isotonen Puffermediums und zum Schwellen mit 5 ml eisgekühltem, hypotonem Lysing-Medium (siehe 3.1.) versetzt und vorsichtig vermischt. Nach 15 sec. nichtgeklärter Zentrifugation bei 900 x g wurde der Unterstand mit einer Spritze abgesaugt und verworfen. Zur osmotischen Lysis der Zellen wurde fünfmal nacheinander folgendes Verfahren angewandt: Zugabe von 5 ml hypotonem Lysing-Medium zu den gepackten Zellen einschließlich Fett. Eine Minute lang, etwa 20 mal, wurde das Zentrifugenröhrchen um 180° gekippt. Anschließend 15 sec. Zentrifugation bei 900 x g. Danach wurde das trübe Medium und das Pellet, nicht aber Zellen und Fett im Überstand, mit einer Spritze abgezogen und in einem gekühlten Zentrifugenglas gesammelt. Das Medium im Unterstand wurde im Verlauf des Verfahrens immer klarer, das Volumen der gepackten Zellen und des Fetts infolge fortschreitender Lysis immer kleiner. Die Sedimentmenge nach jeder Zentrifugation war ein Index für den Grad der Lysis nach jedem Schritt; die größte konnte nach dem zweiten Durchgang beobachtet werden, die kleinste nach dem fünften.

Das im Verlauf der Zell-Lysis gesammelte, abgezogene Medium und Pellet wurde 15 Min. bei 900 x g in einer gekühlten SORVALL Zentrifuge zentrifugiert. Dem Sediment wurden 5 ml 1 mM KHCO_3 zugegeben und wieder 15 Min. bei 900 x g zentrifugiert.

Dieses zweite Pellet enthielt die Fettzell-Ghost-Fraktion und wurde mit 1 mM KHCO_3 auf eine Proteinkonzentration von 4 - 6 mg/ml verdünnt. 8 Tiere ergaben 4 bis 6 mg Ghost-Protein, welches sofort im Adenylatzyklase-Assay weiterverarbeitet wurde.

3.9. Präparation von Fettzell-Plasmamembranen

Durchgeführt nach der von AVRUCH und WALLACH (1) beschriebenen Methode.

Erster Schritt war das Homogenisieren der isolierten Fettzellen. Nach dem Lösen der gepackten Zellen (Präparation siehe Abschnitt 3.2.) in 20 ml Puffer (0,25 M Sucrose, 5 mM TRIS-HCl, pH 7,4) wurde die Suspension durch die in einer MILLIPORE-Filterspritze auftretenden Scherkräfte homogenisiert. Anschließend Zentrifugation (SORVALL RC 20, 20 000 x g, 3 Minuten, 20°C). Absaugen von Pellet und trübem Unterstand mit einer Spritze und Lagerung im Eisbad (1 mM EDTA). Weiterhin sechsmaliges Homogenisieren mit der Filterspritze.

Zur nachfolgenden Mikrosomenfraktionierung fand eine präparative BECKMAN L 2-50 Ultrazentrifuge Verwendung. 10 ml Homogenat wurden auf einen linearen Sucrose-Gradienten geschichtet (27 ml, 27,6 - 54,1 %, Dichte 1,18 - 1,185 bei 4°C, 5 mM TRIS-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA) und zentrifugiert (SW 27 Rotor, 25 000 Upm, 4°C, 90 Minuten). Bis zu einer Dichte von 1,18 (4°C) fand sich die Mikrosomenzone, die abgezogen und in dreifachem Wasservolumen (aqua bidest.) verdünnt wurde. Erneut Zentrifugation (SW 40 Rotor, 40 000 Upm, 4°C, 30 Minuten). Dieses Pellet enthielt die Mikrosomenfraktion; zur Reinigung von Protein wurde sie in 10 mM TRIS-HCl (pH 8,6) gelöst und nochmals homogenisiert. Anschließend Zentrifugation (SW 40 Rotor, 40 000 Upm, 4°C, 30 Minuten) und Lösen des Pellets in 1 mM TRIS-HCl, pH 8,6.

Zur folgenden Plasmamembranpräparation zuerst Dialyse der Mikrosomenfraktion gegen ein 200-faches Puffervolumen (1 mM TRIS-HCl, pH 8,6, 0,5 mM MgSO_4 , 2 Stunden mit einem Pufferwechsel). Danach Auftragen der Suspension auf einen diskontinuierlichen Dextran-Gradienten (zweifaches Volumen, Dichte 1,0400 - 1,0425, 1 mM TRIS-HCl, pH 8,6, 0,5 mM MgSO_4) und Zentrifugation (BECKMAN L 2-50, Rotor SW 50, 40 000 Upm, 4°C, 3 Stunden). Das Material über dem Dextran enthielt die Plasmamembranfraktion, die mit 1 mM KHCO_3 auf eine Proteinkonzentration von 4 - 6 mg/ml verdünnt und entweder sofort im Adenylatzyklase-Assay weiterverarbeitet oder tiefgefroren wurde.

3.10. Adenylatzyklase-Assay

Im folgenden wird ein Testverfahren nach SALOMON et. al. (64) zur Aktivitätsbestimmung der Adenylatzyklase beschrieben. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Umwandlung des radioaktiven Substrates ATP zum ebenfalls radioaktiven Reaktionsprodukt cAMP durch das Enzym Adenylatzyklase. Verschiedene Hormone und Substanzen im Testansatz verändern die Adenylatzyklase-Aktivität. Nach Reaktionsende werden Substrat und Reaktionsprodukt durch Säulenchromatographie voneinander getrennt und die Menge des entstandenen radioaktiven cAMP bestimmt.

a) Adenylatzyklase-Ansatz

50 bis 100 µg 'Membran-' oder 'Ghost-'Protein (bestimmt nach LOWRY et. al. (48) werden 10 Min. bei 37 °C in folgendem Inkubationsmedium mit einem Testvolumen von 0,1 ml inkubiert:

- 20 mM TRIS-HCl pH 7,4
 - 4,5 mM MgCl₂
 - 1 mM 3':5'-AMP
 - 0,45 mM ($\alpha^{32}\text{P}$) ATP 1 mCurie/ml
 - 1 g% Albumin
 - 10 mM Kreatinphosphat
 - 300 µg/ml Kreatinphosphokinase
- } als ATP regenerierendes System
- Isoproterenol, NaF und Tetracain wie in den Abbildungen und Tabellen angegeben.

Start der Reaktion durch das Enzym-Protein; beendet wird sie durch Zugabe von 0,1 ml 'Stopplösung' (2 g% Natrium-Dodecylsulfat, 40 mM ATP, 1,4 mM cAMP, pH 7,5). Unmittelbar nach dem Mischen von Ansatz und 'Stopplösung' werden die Proben 2 Minuten im Wasserbad bei 100 °C zur Proteindenaturierung erhitzt. Zur Bestimmung der cAMP-Wiederfindung während der Säulentrennung von (^{32}P)ATP und (^{32}P)cAMP wurde den Proben 20 µl (^3H)cAMP 0,25 mCurie/ml zugegeben.

b) Chromatographische Trennung von ATP und cAMP

DOWEX - SÄULE (siehe auch 3.1. Anhang)

Den 220 µl Inkubationsgemisch aus Ansatz, 'Stopplösung' und (^3H)cAMP werden 380 µl H₂O zugegeben, vermischt und auf die Säule aufgetra-

gen. Im ersten Waschvorgang werden 600 μ l H_2O , im zweiten 1000 μ l H_2O zugegeben; das Eluat aus beiden enthält $(^{32}P)ATP$ und wird deswegen verworfen. Anschließend werden 3,0 ml H_2O auf die Säule gegeben. Das daraus gewonnene Eluat enthält das zu bestimmende $(^{32}P)cAMP$; es wird zur weiteren Reinigung auf die Aluminium-Säule aufgetragen.

ALUMINIUM-SÄULE (siehe auch 3.1. Anhang):

Das Eluat aus der DOWEX-Säule wird mit 0,2 ml Imidazol-HCl 1,5 M pH 7,2 vermischt und über die ALUMINIUM-Säule gegeben. Zusätzlich wird 1 ml Imidazol-HCl 0,1 M pH 7,5 aufgetragen.

Das gesamte Eluat wird in 10 ml ROTH-Scintigel enthaltenden PACKARD-Gefäßen gesammelt und im MARK II Isotopenzähler bestimmt. Die Menge des gebildeten $(^{32}P)cAMP$ wird berechnet.

Die Wiederfindung des zugegebenen $(^3H)cAMP$ beträgt etwa 70% (57).

4. Einfluß der Inkubationsbedingungen auf cAMP und Lipolyse

4.1. Katecholamin- und Insulinwirkung

Wie schon in der Einleitung erwähnt, wurde in Vorversuchen zunächst die vielfach in der Literatur beschriebene Katecholamin- und Insulinwirkung auf cAMP und Lipolyse isolierter Fettzellen unter unseren Versuchsbedingungen gemessen. Hierbei sollte das Versuchssystem genauer charakterisiert werden.

Basale cAMP-Spiegel:

Ohne Hormonzusatz zum Inkubationsmedium veränderten sich die basalen cAMP-Spiegel während 60 Minuten Inkubation nicht (Tabelle 4.1.).

Isoproterenol- und Insulinwirkung auf cAMP-Spiegel:

Katecholamine erhöhen die cAMP-Spiegel isolierter Fettzellen. Abbildung 4.1. und 4.3. zeigen die Dosiswirkungskurven des β adrenergen Katecholamins Isoproterenol. Im Konzentrationsbereich zwischen $10^{-8}M$ und $10^{-6}M$ steigen die cAMP-Spiegel steil von basalen auf maximale Werte an. Weil die cAMP-Spiegel bei einer Isoproterenolkonzentration von $10^{-6}M$ maximal stimuliert waren und auch andere Gruppen (z. B. 32) bei dieser Katecholaminmenge maximale Wirkungen beobachteten, wurde zur Stimulation der cAMP-Spiegel in allen folgenden Versuchen diese Isoproterenoldosis verwendet. Insulin in einer Konzentration von $100 \mu E/ml$ hemmt die cAMP-Spiegel maximal (31). Wird Insulin gleichzeitig mit Isoproterenol isolierten Fettzellen zugegeben, erniedrigt Insulin den Anstieg der cAMP-Spiegel im Vergleich zu alleiniger Behandlung mit Isoproterenol ($10^{-6}M$). Die Spiegel erreichen nur Werte in der doppelten Größenordnung der Basalwerte (Abbildung 4.1.).

Anfangskinetik der cAMP-Spiegel:

Abbildung 4.2. zeigt die Anfangskinetik der cAMP-Spiegel. Zum Zeitpunkt 0 werden beide Hormone der Fettzellsuspension zugegeben und die cAMP-Spiegel im Abstand von 0,5 bzw. 1,0 Minuten gemessen. Unmittelbar nach Isoproterenolzusatz ($10^{-6}M$) steigen die cAMP-Spiegel steil an, um nach 1 Minute ein Maximum zu erreichen und unter leichtem Abfall in ein Plateau zu münden. Es war interessant, auch den Insulineffekt auf die Anfangskinetik der stimulier-

ten cAMP-Spiegel zu untersuchen (Abb. 4.2.). Wird den Zellen gleichzeitig Insulin ($100 \mu\text{E/ml}$) und Isoproterenol (10^{-6}M) zugegeben und die cAMP-Spiegel bestimmt, führt Insulin schon nach 0,5 Minuten zu einer Hemmung des cAMP-Anstiegs; diese wird nach 1 Minute noch deutlicher und liegt 5 Minuten nach Hormonzugabe bei etwa 50%.

Isoproterenol- und Insulinwirkung auf die Lipolyse:

Die Lipolyserate isolierter Fettzellen wurde als Glyzerinfreisetzung ins Inkubationsmedium in Gegenwart von Isoproterenol gemessen. In einer Konzentration von 10^{-6}M erhöht es die basale Lipolyse auf etwa 14-fache Werte (Tabelle 4.2.).

Insulin ist auch hier ein Antagonist der Katecholaminwirkung. $100 \mu\text{E/ml}$ Insulin wirken maximal antilipolytisch (24). Insulin ($100 \mu\text{E/ml}$) hemmt die Isoproterenol (10^{-6}M) induzierte Lipolyse um etwa 40% (Tabelle 4.2.).

Von den bisherigen Ergebnissen ist also festzuhalten, daß Katecholamine sowohl die cAMP-Spiegel als auch die Lipolyserate erhöhen. Insulin wirkt Katecholaminen entgegengesetzt: Es hemmt die Lipolyse und die cAMP-Spiegel.

Vergleich der Isoproterenolwirkung auf cAMP und Lipolyse:

Abbildung 4.3. zeigt die Dosiswirkungskurve des Isoproterenols auf cAMP-Spiegel und Lipolyserate isolierter Fettzellen. Beide Parameter werden durch das Katecholamin stimuliert. Allerdings werden die Lipolyseraten nach 60 Minuten Inkubation mit der cAMP-Konzentration nach 5 Minuten in Beziehung gesetzt. Während die Lipolyse über 60 Minuten linear ansteigt (Daten hier nicht aufgeführt), ist bereits nach 1 Minute Inkubation das Maximum der cAMP-Spiegel erreicht (Abb. 4.2.). Entsprechend dem auf Abb. 1.1. gezeigten Schema bestimmt wahrscheinlich die initiale Konzentration von cAMP den Aktivierungsgrad des Proteinkinase-Lipase-Systems, so daß ein Vergleich gerechtfertigt erscheint. Dabei fällt die quantitative Diskrepanz im unteren Isoproterenolkonzentrationsbereich zwischen 10^{-10}M und 10^{-7}M auf. Während beispielsweise bei Isoproterenol 10^{-8}M die cAMP-Spiegel nur um etwa 20% über basal stimuliert sind, ist die Lipolyserate beinahe maximal aktiviert. Im oberen Konzentrationsbereich zwischen 10^{-7}M und 10^{-5}M verlaufen dagegen cAMP-Spiegel und Lipolyse wieder parallel. Diese Diskrepanz läßt sich auf der Basis einer Kompartimentierung des zycli-

Tabelle 4.1.
cAMP-Basalspiegel

cAMP-Basalspiegel nach 5 Minuten Inkubation (ohne Hormonzugabe zum Medium).

Inkubationsmethode: Einzelproben

Meßwerte: cAMP pmol/ 10^5 Zellen

Puffersystem	Zahl der Versuche (n)	MW $\pm$ s.e.m.
TRIS-ALBUMIN	15	2,1 $\pm$ 0,34
HEPES-ALBUMIN	3	3,9 $\pm$ 1,34

Die Spiegel blieben während einer Stunde konstant.

Tabelle 4.2.

Einfluß von Insulin auf die durch Isoproterenol stimulierte Lipolyserate isolierter Fettzellen

Isolierte Fettzellen wurden 60 Minuten in TRIS-Albumin-Puffer inkubiert und die Glycerinfreisetzung ins Medium bestimmt.

Meßwerte: Glycerin nMol/ 10^5 Zellen x 60 Minuten

Basal	21
Isoproterenol 10^{-6} M	300
Isoproterenol 10^{-6} M	182
+ Insulin 100 μ E/ml	

Abbildung 4.1.

Isoproterenol Dosis-Wirkungskurve und Insulineffekt
(100 μ E/ml) auf die cAMP-Spiegel

Isoproterenol wurde in den angegebenen Konzentrationen
dem Inkubationsmedium zugegeben. Bestimmung der cAMP-
Spiegel nach 5 Minuten.

Inkubationsmethode: Einzelproben

Inkubationsmedium: TRIS-Albumin

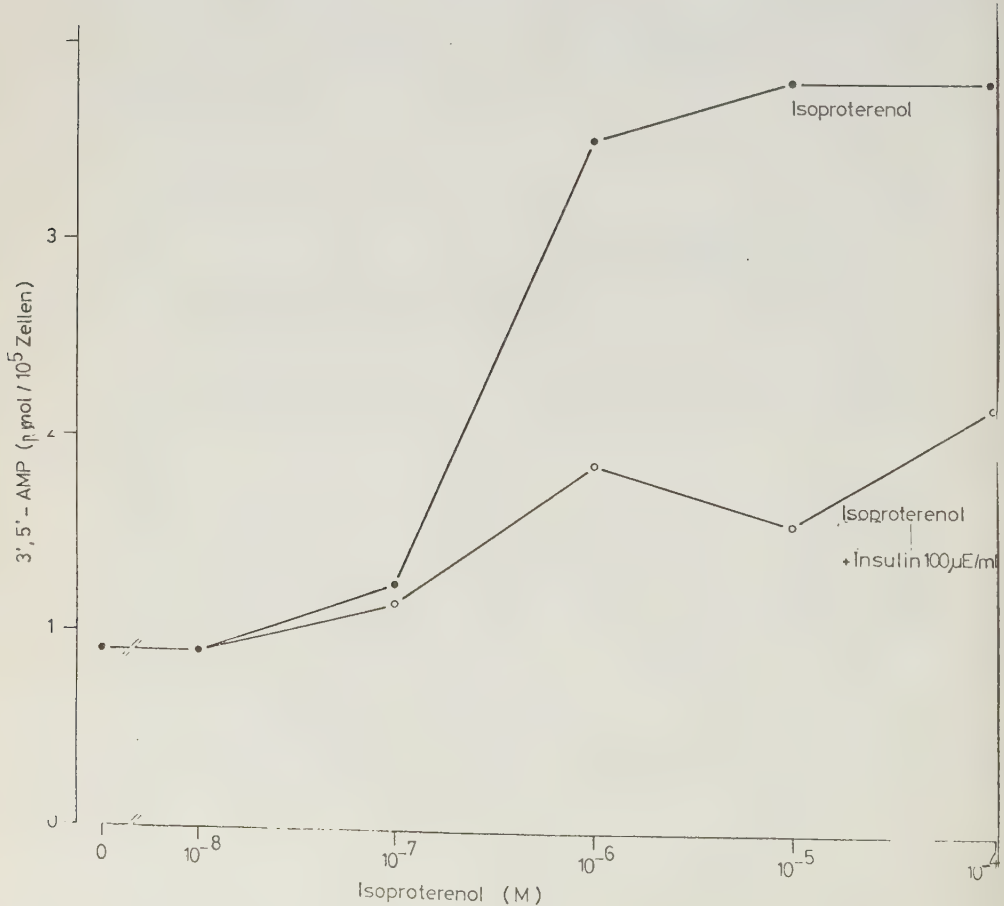


Abbildung 4.2.

Insulineffekt auf die cAMP-Anfangskinetik in Gegenwart von Isoproterenol

Isolierte Fettzellen wurden 0,5 / 1 / 2 / 3 / 5 Minuten in Einzelproben in Gegenwart von Isoproterenol (10^{-6} M) bzw. Isoproterenol (10^{-6} M) + Insulin ($100 \mu\text{E/ml}$) inkubiert. TRIS-Albumin-Puffer

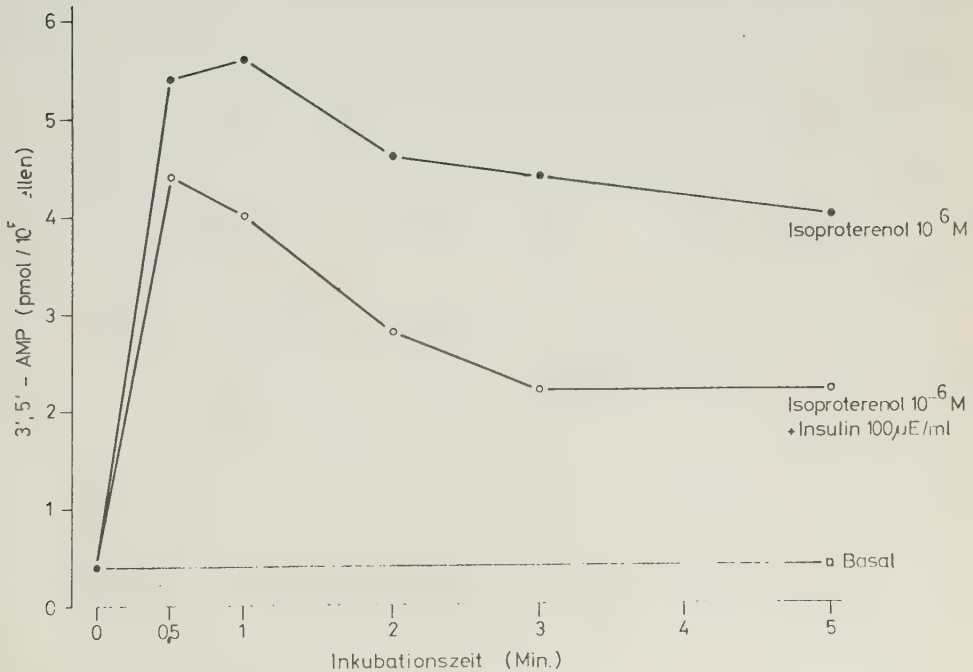
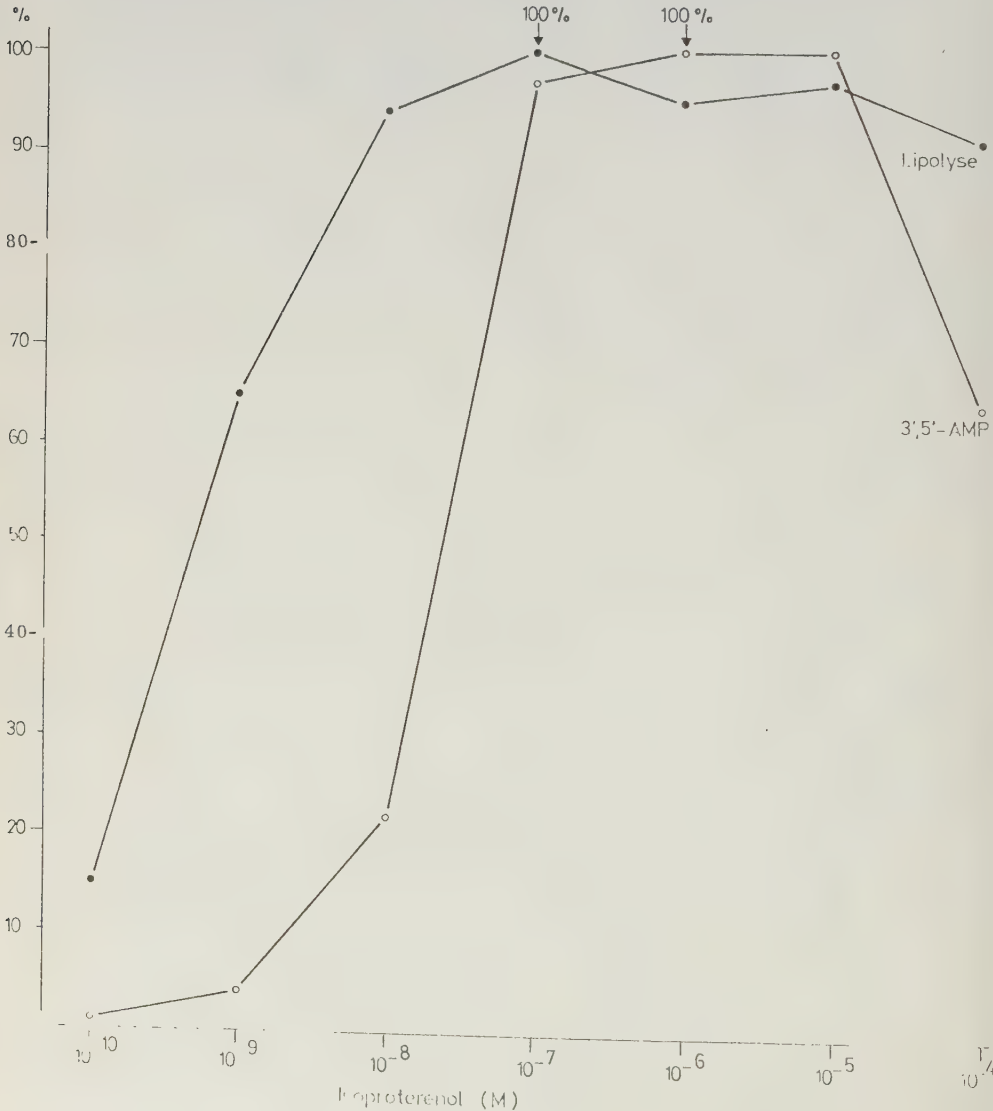


Abbildung 4.3.

Vergleich der Isoproterenolwirkung auf cAMP und Lipolyse

Isoproterenol wurde in den angegebenen Konzentrationen isolierten Fettzellen zugegeben und cAMP-Spiegel nach 5 Minuten, die Glycerinfreisetzung nach 60 Minuten Inkubation bestimmt. Zellen für cAMP- und Lipolysebestimmung aus einem Pool.
Inkubationsmethode: Einzelproben; HEPES-Puffer.

Von den Meßwerten wurden die Basalwerte abgezogen. Der Maximalwert entspricht 100 %! Dieser beträgt für cAMP $69,0 - 5,5 \text{ pmol}/10^5 \text{ Zellen} \times 5 \text{ Minuten}$, für Glycerin $475 - 70 \text{ nmol}/10^5 \text{ Zellen} \times 60 \text{ Minuten}$.



schen Nucleotids in metabolisch aktive und inaktive Kompartimente erklären (siehe auch Diskussion).

4.2. Wirkung von Adenosin-Desaminase (ADA) auf die cAMP-Spiegel

Die Inkubation isolierter Fettzellen mit einem lipolytischen Hormon führt zu einem schnellen Anstieg der cAMP-Konzentration (Abschnitt 4.1., Abbildung 4.2.). Der raschen Erhöhung folgt eine Plateauphase, während der die Spiegel des zyklischen Nucleotids konstant bleiben oder leicht abfallen. Gleichzeitig verläuft die Lipolyse mit der ursprünglichen Rate linear ansteigend.

Dieser in Abschnitt 4.1. beobachtete und auch in der Literatur (6, 67) beschriebene cAMP-Abfall wurde einer "Feedback-Hemmung" der Adenylatzyklase zugeschrieben, die möglicherweise eine überschießende cAMP-Produktion verhindert und somit einem unnötigen ATP-Verbrauch für die Hormonsignalübertragung entgegenwirkt. Neben einem unbekannten Inhibitor (35) und freien Fettsäuren (60) wurde besonders der Fettzellmetabolit Adenosin (18, 67) als mögliche Hemmsubstanz erwogen. SCHWABE et. al. (67) finden eine Adenosinfreisetzung isolierter Fettzellen ins Inkubationsmedium, die jedoch von Hormon- und insbesondere Katecholaminreizen unabhängig ist. Außerdem senkt Adenosin die cAMP-Spiegel (26, 67) und wirkt antilipolytisch (13). Darüberhinaus finden FAIN et. al. (18) eine Hemmung der stimulierten Adenylatzyklase in Fettzell-Ghosts und der Phosphodiesterase in Fettzellhomogenaten durch Adenosin. Trotz dieser Daten ist die physiologische Funktion des Adenosins am Fettgewebe bisher unklar.

Für die isolierte Fettzelle sollte in dieser Arbeit die Adenosinwirkung auf die Höhe der cAMP-Spiegel untersucht werden. Um den hemmenden Adenosineffekt auf die cAMP-Konzentration in unseren Messungen auszuschalten, wurde Adenosin-Desaminase (ADA) verwendet. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Adenosin zum 1000-fach schwächer wirksamen Inosin (13).

Basale cAMP-Spiegel werden durch ADA-Zugabe nicht verändert (Tabelle 4.3.). Wird ADA in einer Konzentration von 1 µg/ml oder 100 µg/ml nicht stimulierten, isolierten Fettzellen zugegeben, so verändern sich die cAMP-Spiegel nur unwesentlich. Adenosin

scheint also die Höhe basaler cAMP-Spiegel nicht zu beeinflussen. Außerdem kann eine aktivierende Adenosin-Desaminase-Eigenwirkung ausgeschlossen werden.

Andere Verhältnisse liegen jedoch in dem von Katecholaminen stimulierten System vor (Tabelle 4.4.). Die ADA-Zugabe (1 - 100 µg/ml) führt dosisabhängig über die Isoproterenolstimulation (10^{-6} M) hinaus zu einem bis 12-fachen Anstieg der cAMP-Konzentration. Ebenso erhöhen sich die cAMP-Spiegel der Anfangskinetik (Abbildung 4.4.) in Gegenwart von ADA im Vergleich zu alleiniger Isoproterenol-Applikation (10^{-6} M).

Aufgrund dieser Ergebnisse hemmt also eine endogene Adenosinfreisetzung ins Inkubationsmedium den Anstieg der cAMP-Spiegel. Je vollständiger das Nucleotid Adenosin abgebaut wird, desto geringer die Hemmung der cAMP-Spiegel, desto höher die cAMP-Konzentration der isolierten Fettzellen.

Ebenfalls SCHWABE et. al. (68) berichten über eine verstärkte Insulinwirkung durch Adenosin. Adenosin erleichtert danach den Insulineffekt. Interessant war nun die Frage, ob Insulin auch in Abwesenheit von Adenosin bzw. in Gegenwart von ADA maximal stimulierte cAMP-Spiegel senkt.

In unseren Versuchen erniedrigte Insulin in maximal wirksamer Konzentration (100 µE/ml) die durch Isoproterenol (10^{-6} M) stimulierten cAMP-Spiegel sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von ADA (Tabelle 4.5.). Der cAMP erniedrigende Insulineffekt ist also von Adenosin im Medium und der absoluten Höhe der cAMP-Spiegel unabhängig. Adenosin und Insulin erhöhen bzw. senken folglich die cAMP-Spiegel unabhängig voneinander.

4.3. Einfluß der Zellkonzentration auf die cAMP-Spiegel

SCHWABE et. al. (67) berichteten über eine Abhängigkeit der Höhe der cAMP-Spiegel von der Zellkonzentration im Inkubationsmedium. Danach erreichten die cAMP-Spiegel einer Fettzellsuspension von 20 000 Zellen/ml zehnfach höhere Werte als die in einer Suspension von 100 000 Zellen/ml.

Da jedoch die meisten Studien (z. B. 70, 77) über die hormonelle Regulation der cAMP-Spiegel und der Lipolyse mit Zellzahlen zwischen 100 000 Zellen/ml und 200 000 Zellen/ml durchgeführt wur-

den, schien es in vorliegender Arbeit wichtig, in diesem Bereich den Einfluß der Zellkonzentration auf das Versuchssystem zu untersuchen (Tabelle 4.6.).

Die basalen, Katecholamin-stimulierten und durch Insulin erniedrigten cAMP-Spiegel von Fettzellsuspensionen von 92 000, 138 000, 184 000 Zellen/ml wurden bestimmt. Hier zeigte sich bei abnehmen-der Zellkonzentration eine gering ansteigende Tendenz der cAMP-Spiegel. Deswegen wurde bei allen weiteren Versuchen eine konstante Zellkonzentration angestrebt. Sie lag im Durchschnitt bei 143 000 Zellen/ml ± 5747 M.W. $\pm$ s.e.m., $n = 15$

Tabelle 4.3.

Einfluß von Adenosin-Desaminase (ADA) auf die cAMP-Spiegel

Fettzellen wurden für 5 Minuten ohne ADA, mit 1 μ g/ml ADA und 100 μ g/ml ADA in TRIS-Albumin-Puffer enthaltenden Einzelproben inkubiert.

Angabe der Meßwerte in: cAMP pmol/ 10^5 Zellen

Zusätze zum Medium	Exp. I	Exp. II	Exp. III
Keine	9,2	24,0	11,4
ADA 1 μ g/ml	7,95	22,0	13,4
ADA 100 μ g/ml		25,0	

Tabelle: 4.4.

Wirkung von Adenosin-Desaminase auf die durch Isoproterenol maximal stimulierten cAMP-Spiegel

Isolierte Fettzellen wurden in Gegenwart von Isoproterenol (10^{-6}M) ohne und mit Adenosin-Desaminase (ADA) $1,0\text{ }\mu\text{g/ml}$, $10,0\text{ }\mu\text{g/ml}$ und $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ in TRIS-Albumin-Puffer enthaltenen Einzelproben 5 Minuten inkubiert und die cAMP-Spiegel bestimmt.

Meßwerte: cAMP pmol/ 10^5 Zellen bzw. % (Iso. 10^{-6} entspricht 100 %)

Zusätze zum Inkubations- medium	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Exp. IV	n	MW $\pm$ s.e.m.
Isoproterenol 10^{-6}M	9,6	12,7	27,4	9,1	4	$14,7 \pm 4,3$
	100%	100%	100%	100%		100%
Iso 10^{-6}M	18,5	25,8	54,0		3	$32,7 \pm 10,8$
+ ADA $1\text{ }\mu\text{g/ml}$	192%	203%	197%			$197\% \pm 3,1\%$
Iso 10^{-6}M	48,0	68,4			2	$58,2 \pm 10,2$
+ ADA $10\text{ }\mu\text{g/ml}$	500%	538%				$519\% \pm 19\%$
Iso 10^{-6}M		277,0	191,0	81,0	3	$183 \pm 56,7$
+ ADA $100\text{ }\mu\text{g/ml}$		2181%	697%	890%		$1256\% \pm 465$

Abbildung 4.4.

Einfluß von Adenosin-Desaminase (ADA) auf die cAMP-Anfangskinetik

Eine Fettzellsuspension ("Pool") wird zum Zeitpunkt $t = 0$ mit Isoproterenol ($10^{-6}M$) versetzt. 20, 40, 60, 90, 120, 240 Sekunden später werden Proben zur cAMP-Bestimmung entnommen.

(untere Kurve)

Eine andere Fettzellsuspension wird 1 Minute mit Adenosin-Desaminase ($1 \mu g/ml$) versetzt. Zum Zeitpunkt $t = 0$ (bzw. $t = 60$ sec.) wird Isoproterenol ($10^{-6}M$) zugegeben. Nach 20, 40, 60, 90, 120, 240 Sekunden werden wieder Proben zur cAMP-Messung entnommen.

(obere Kurve)

Auftragung der Meßwerte in cpm; TRIS-Albumin-Puffer

Inkubationsmethode: "Pool", siehe Abschnitt 3.3.c

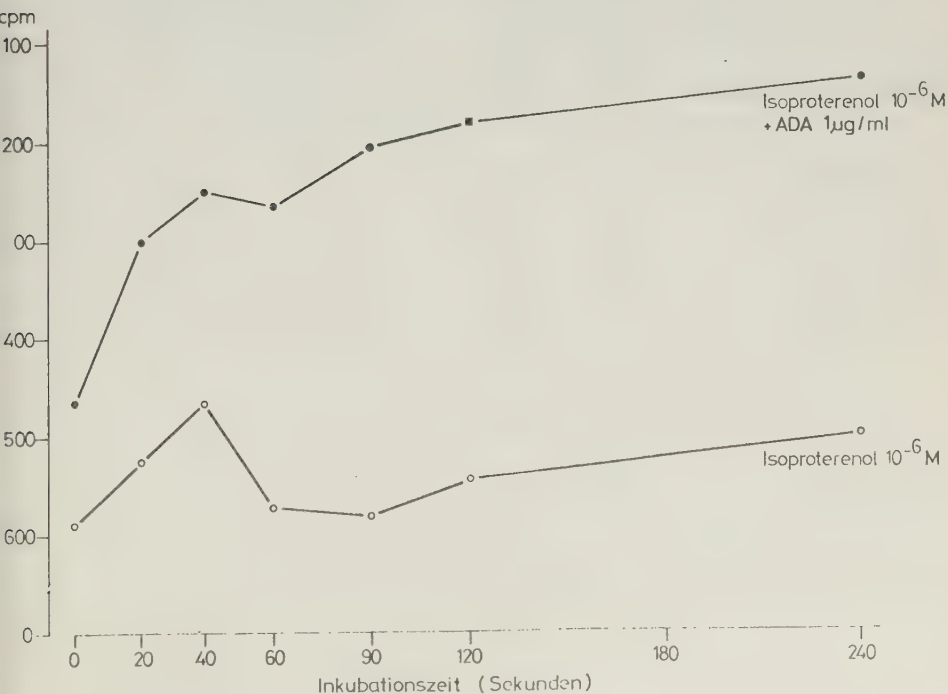


Tabelle: 4.5.

Insulinwirkung auf die cAMP-Spiegel in Gegenwart von Adenosin-Desaminase und Isoproterenol

Die cAMP-Spiegel isolierter Fettzellen wurden durch Isoproterenol ($10^{-6}M$) bzw. Isoproterenol ($10^{-6}M$) + Insulin ($100 \mu E/ml$) stimuliert. Adenosin-Desaminase wurde entweder nicht zugegeben oder in einer Konzentration von $1 \mu g/ml$ bzw. $100 \mu g/ml$ zum TRIS-Albumin-Inkubationsmedium zugefügt.

Inkubationsdauer: 5 Minuten.

Inkubationsmethode: Einzelproben

Angabe der Meßwerte in cAMP pmol/ 10^5 Zellen oder %

Hormone und Zusätze	Exp.I	Exp.II	n	MW
Iso $10^{-6}M$	27,4	9,1		
	100%	100%		
Iso $10^{-6}M$	19,8	6,3		
+ Insulin $100 \mu E/ml$	72 %	69 %	2	70,5 %
Iso $10^{-6}M$	54,0			
+ ADA $1 \mu g/ml$	100%			
Iso $10^{-6}M$	27,1			
+ ADA $1 \mu g/ml$	50,2%			
+ Insulin $100 \mu E/ml$				
Iso $10^{-6}M$	191,0	81,0		
+ ADA $100 \mu g/ml$	100 %	100 %		
Iso $10^{-6}M$	141,0	29,1		
+ ADA $100 \mu g/ml$	73 %	35 %		
+ Insulin $100 \mu E/ml$				

Tabelle: 4.6.

Abhängigkeit der cAMP-Spiegel von der Zellkonzentration im Inkubationsmedium

3 verschiedene Verdünnungsstufen einer Fettzellsuspension wurden ohne Zusätze, in Gegenwart von Isoproterenol (10^{-6}M) oder Isoproterenol (10^{-6}M) + Insulin ($100\text{ }\mu\text{E/ml}$) in Einzelproben 5 Minuten inkubiert. TRIS-Albumin-Puffer.

Angabe der gemessenen cAMP-Spiegel in $\text{pmol}/10^5$ Zellen.

Fettzellen/ml	Basal- bedingungen	Isoproterenol (10^{-6}M)	Isoproterenol (10^{-6}M) + Insulin ($100\text{ }\mu\text{E/ml}$)
92 000	1,4	8,8	6,4
138 000	1,4	7,4	4,4
184 000	1,3	5,6	3,4

5. Bedeutung extrazellulärer Calcium-Ionen bei der Regulation von cAMP und Lipolyse

Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist die kausale Bedeutung der cAMP-Senkung für die Lipolysehemmung durch Insulin nicht unumstritten (19, 41, 70). Als alternativer Mechanismus wurde deswegen in verschiedenen neueren Studien (41, 44) Calcium als intrazellulärer 'second messenger' der Insulinwirkung diskutiert.

Die für die Lipolyseregulation notwendigen Calcium-Ionen könnten intrazellulären Depots entstammen oder aus dem Extrazellulärraum ins Zytosol aufgenommen werden. Letztere Möglichkeit wurde in diesem Abschnitt untersucht. Dabei wurde die Frage besonders beachtet, ob der antilipolytische und die cAMP-Spiegel senkende Insulineffekt von extrazellulären Calcium-Ionen beeinflusst wird.

Abbildung 5.1. zeigt die Isoproterenol Dosiswirkungskurven auf die cAMP-Spiegel in Ca^{++} -freiem (TRIS) und Ca^{++} -haltigem (HEPES, $\text{CaCl}_2 = 2,5 \text{ mM}$) Puffersystem (siehe Kapitel 3.1.). Auffallend ist die Linksverschiebung des cAMP-Anstiegs sowie das erhöhte Niveau in Ca^{++} -haltigem Medium. In beiden wird jedoch die maximale Stimulation bei einer Isoproterenolkonzentration von 10^{-6} M erreicht. Ob der quantitative Unterschied auf die veränderte Ionenzusammensetzung oder eine bessere pH-Stabilität des HEPES-Puffersystems zurückzuführen ist, wäre zu untersuchen.

Abbildung 5.2., 5.3. und 5.4. zeigen die Anfangskinetiken der cAMP-Spiegel in Gegenwart von Isoproterenol bzw. Isoproterenol + Insulin. In TRIS-Albumin-Puffer zeigen sie den typischen, in Kapitel 4.1. beschriebenen Verlauf (Abb. 5.2.). Insulin hemmt den Anstieg des zyclischen Nucleotids.

EGTA ist ein Ca^{++} -Ionen spezifisch bindender Chelator (55). Werden die Fettzellen 3 Minuten mit diesem vorinkubiert, Dosis wie (17), und die cAMP-Spiegel durch Isoproterenol (10^{-6} M) oder Isoproterenol + Insulin (100 µE/ml) stimuliert, zeigt die Kinetik nur geringfügige Unterschiede im Vergleich zu nicht mit EGTA vorbehandelten Zellen (Abb. 5.2.). Der cAMP senkende Insulineffekt ist unverändert vorhanden. Werden den isolierten Fettzellen Ca^{++} -Ionen ($0,05 \text{ mM}$ Abb. 5.3. oder $0,5 \text{ mM}$ Abb. 5.4.) über die EGTA-

Sättigung hinaus zugefügt, zeigen die Kinetiken der cAMP-Spiegel ebenfalls nur minimale Veränderungen im Vergleich zu alleiniger EGTA-Behandlung. Die CaCl_2 -Zugabe hat also keinen deutlichen Effekt auf die Insulinwirkung.

Ähnliche Verhältnisse finden sich auch bei der Lipolyseregulation (Tab. 5.1.). Hier wird die Bedeutung extrazellulärer Ca^{++} -Ionen auch durch Verwendung von Ca^{++} -freiem (TRIS-Albumin) und Ca^{++} -haltigem (HEPES-Albumin, $\text{CaCl}_2 = 2,5 \text{ mM}$) Inkubationspuffer untersucht. Sowohl die antilipolytische Insulin- ($100 \text{ } \mu\text{E/ml}$) wie auch die lipolytische Isoproterenolwirkung (10^{-6} M) werden durch extrazelluläre Ca^{++} -Ionen nur unwesentlich quantitativ verändert.

Aus den genannten Ergebnissen kann zusammenfassend festgehalten werden, daß extrazelluläre Ca^{++} -Ionen den antilipolytischen und die cAMP-Spiegel senkenden Insulineffekt nicht beeinflussen (siehe auch Diskussion, Kapitel 8.5.).

Abbildung 5.1.

Vergleich der Isoproterenol-Dosiswirkungskurve mit und ohne Calcium im Inkubationsmedium

Isolierte Fettzellen wurden 5 Minuten in HEPES-Albumin-Puffer ($\text{CaCl}_2 = 2,5 \text{ mM}$) oder TRIS-Albumin-Puffer (ohne Ca^{++}) in Abwesenheit (Basalwert) bzw. in Gegenwart der angegebenen Isoproterenol-konzentration inkubiert und die cAMP-Spiegel bestimmt.

Inkubationsmethode: Einzelproben

Basalwerte: $2,0 \text{ pmol cAMP}/10^5 \text{ Zellen}$ (TRIS) bzw. $3,4 \text{ pmol cAMP}/10^5 \text{ Zellen}$ (HEPES) entsprechen 100 %.

3',5'-AMP

üb. Basal

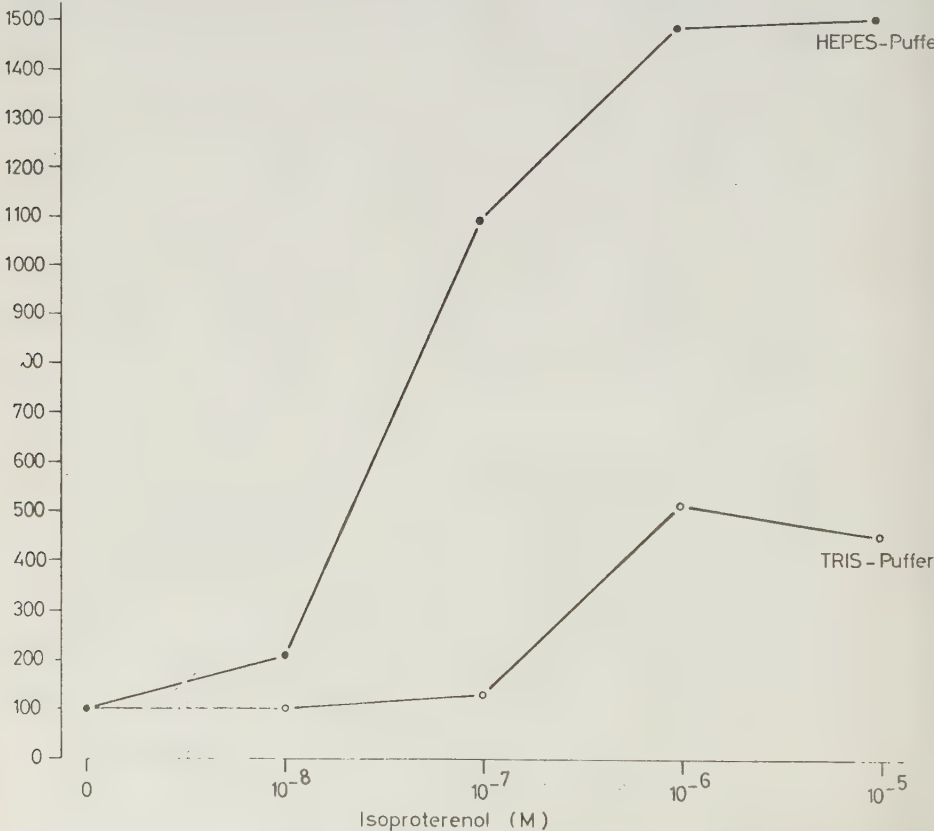
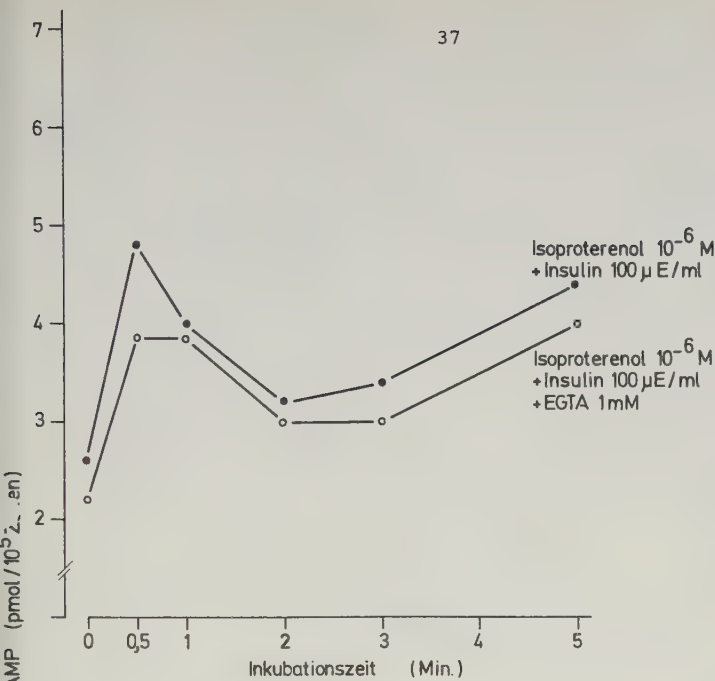


Abbildung 5.2.

Einfluß von EGTA auf die cAMP-Anfangskinetik in Gegenwart von Isoproterenol und Isoproterenol + Insulin



Isolierte Fettzellen wurden 0,5/1/2/3/5 Minuten in TRIS-Albumin-Puffer enthaltenden Einzelproben in Anwesenheit von Isoproterenol (10^{-6}M) bzw. Isoproterenol (10^{-6}M) + Insulin ($100 \mu\text{E/ml}$) inkubiert. Anschließend wurde zu einem anderen Zellpool derselben Präparation EGTA (10^{-3}M) zugegeben und 3 Minuten vorinkubiert. Sofort danach wurden wieder, wie oben, isolierte Fettzellen mit Isoproterenol bzw. Isoproterenol + Insulin für 0,5/1/2/3/5 Minuten inkubiert. Basalspiegel nach 0 Minuten Inkubation. Angabe der Meßwerte in cAMP pmol/ 10^5 Zellen.

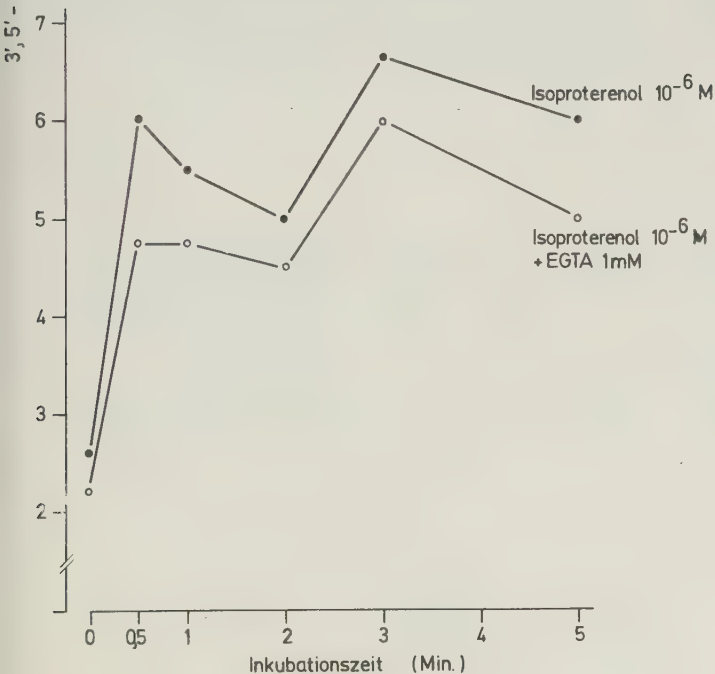


Abbildung 5.3.

Insulin, EGTA, Calcium und die
cAMP-Anfangskinetik

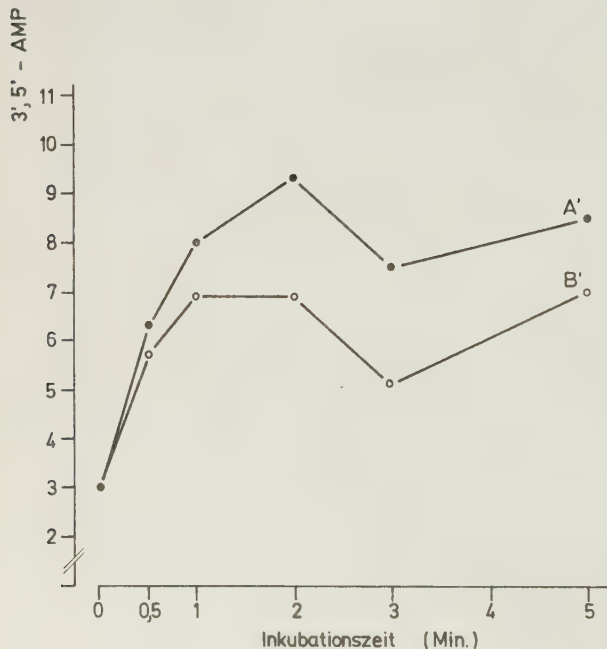
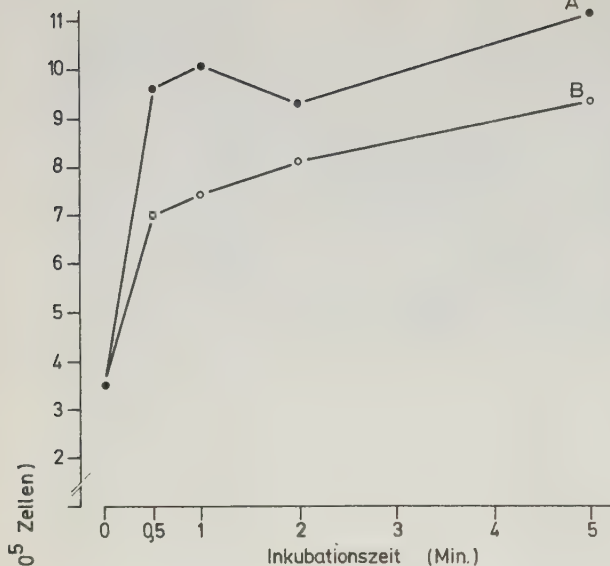
Inkubationsmethode: Einzelproben
Inkubationsmedium: TRIS-Albumin-
Puffer

cAMP-Bestimmung: Nach 0,5/1/2/5
Minuten (A,B) bzw. 0,5/1/2/3/5
Minuten (A',B')

cAMP-Anfangskinetik:

A Isoproterenol (10^{-6} M)
+ EGTA (1 mM)

B Isoproterenol (10^{-6} M)
+ EGTA (1 mM)
+ Insulin (100 μ E/ml)



A' Isoproterenol (10^{-6} M)
+ EGTA (1 mM)
+ CaCl_2 (1,05 bzw. 0,05 mM
über EGTA-Absättigung)

B' Isoproterenol (10^{-6} M)
+ EGTA (1 mM)
+ CaCl_2 (1,05 bzw. 0,05 mM
über EGTA-Absättigung)
+ Insulin (100 μ E/ml)

Abbildung 5.4.

Insulin, EGTA, Calcium und die
cAMP-Anfangskinetik

Inkubationsmethode: Einzelproben

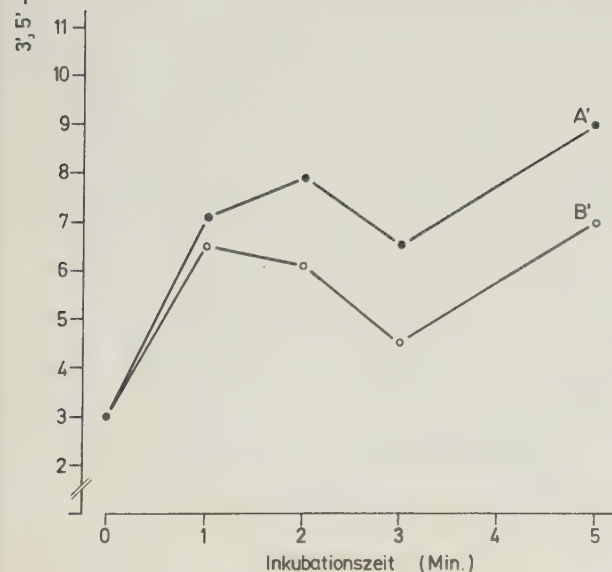
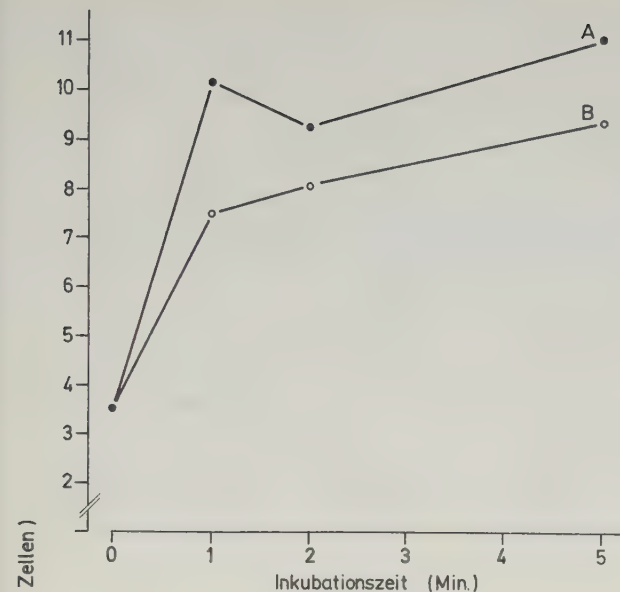
Inkubationsmedium: TRIS-Puffer

cAMP-Bestimmung: Nach 1,0/2,0/
5,0 Min. (A,B) bzw. 1,0/2,0/3,0/
5,0 Min. (A',B')

cAMP-Anfangskinetik:

A Isoproterenol (10^{-6} M)
+ EGTA (1 mM)

B Isoproterenol (10^{-6} M)
+ EGTA (1 mM)
+ Insulin (100 μ E/ml)



A' Isoproterenol (10^{-6} M)
+ EGTA (1 mM)
+ CaCl_2 (1,5 mM bzw. 0,5 mM
über EGTA-Absättigung)

B' Isoproterenol (10^{-6} M)
+ EGTA (1 mM)
+ CaCl_2 (1,5 mM bzw. 0,5 mM
über EGTA-Absättigung)
+ Insulin (100 μ E/ml)

Tabelle 5.1.

Vergleich der Lipolyseraten in TRIS- und HEPES-Puffer

Isolierte Fettzellen wurden 60 Minuten in TRIS-Albumin-Puffer (Ca^{++} -frei) oder KREBS-RINGER-HEPES-Albumin-Puffer (CaCl_2 -2,5 mM) inkubiert und die Glycerinfreisetzung ins Medium bestimmt.

Meßwerte: Glycerin $\text{nMol}/10^5$ Zellen x 60 Minuten

Zusätze zum Inkubations- medium	TRIS-Puffer	KREBS-RINGER-HEPES-Puffer		
		M.W. $\pm$ s.e.m.	n=	
keine (basal)	21	20 $\pm$ 4	9	
Isoproterenol 10^{-6}M	300	334 $\pm$ 34	9	
Isoproterenol 10^{-6}M + Insulin 100 $\mu\text{E}/\text{ml}$	182	157 $\pm$ 25	9	

6. Einfluß von Lokalanaesthetika auf die Lipolyse, die Adenylatzyklase und die cAMP-Spiegel des Fettgewebes

Lokalanaesthetika ermöglichen indirekt das Studium der Bedeutung intrazellulärer Calcium-Ionen für die Lipolyseeregulation. Neben anderen Kationen (59) beeinflussen sie die membranären Calcium-Verschiebungen an verschiedenen Geweben (3).

Veröffentlichungen über eine antilipolytische Lokalanaesthetikawirkung (44, 71) ohne gleichzeitigen Abfall der cAMP-Spiegel (44, 71) unterstützen die Zweifel an der Bedeutung des zyklischen Nucleotids für die Regulation der Antilipolyse durch Insulin und fördern die Annahme, daß Calcium ein alternativer, intrazellulärer 'second messenger' des Insulins ist, der der Aktivierung des Proteinkinase-Lipase-Systems entgegenwirkt.

Zunächst wurde in dieser Arbeit der Lokalanaesthetikaeffekt auf die Lipolyse isolierter Fettzellen untersucht. Es war wichtig, diesen mit der in Kapitel 4. und 5. beschriebenen antilipolytischen Insulinwirkung sowie Ergebnissen aus anderen Studien zu vergleichen (44, 71).

Die Adenylatzyklase der Fettzelle ist ein wichtiger Angriffspunkt des Insulins (58); die antilipolytische Insulinwirkung ist mit einer parallelen Hemmung der Adenylatzyklase im zellfreien Versuchssystem verbunden (58). Ferner ist bekannt, daß das Lokalanaesthetikum Lignocain die Adenylatzyklase von Rattenherzen hemmt (12). Es war deshalb sinnvoll, die Lokalanaesthetikawirkung auch auf die Adenylatzyklase der Fettzelle zu studieren. Wichtig war dabei die Frage, ob der antilipolytische Effekt von Lokalanaesthetika auch gleichzeitig mit einer Hemmung der Adenylatzyklase verbunden ist und somit die ursächliche Beziehung zwischen Adenylatzyklase- und Lipolysehemmung bestätigt wird.

Lokalanaesthetika hemmen wie Insulin die Lipolyse (44, 71) isolierter Fettzellen (vgl. Kapitel 4.). Ausgehend von der Erniedrigung stimulierter cAMP-Spiegel durch Insulin müßte man analog auch eine Hemmung durch Lokalanaesthetika erwarten. Ein derartiger Effekt ist jedoch in der Literatur nicht beschrieben. Dibucain erhöht basale und durch Katecholamine stimulierte cAMP-Spie-

gel (71). Procain hat keine signifikante Wirkung auf erhöhte cAMP-Konzentrationen (44). Aufgrund dieser kontroversen Situation sollte der Effekt des Lokalanaesthetikums Tetracain auf die cAMP-Spiegel isolierter Fettzellen untersucht werden. Unterschiedliche Wirkungen von Insulin und Lokalanaesthetika auf die cAMP-Spiegel der Fettzelle würden die Zweifel am zyklischen Nucleotid im Lipolysemechanismus stärken bzw. die Bedeutung des Calciums für die hormonelle Lipolyseeregulation unterstützen.

Weiter wurde der cAMP-Abbau durch den Phosphodiesterase-Hemmstoff IBMX blockiert. Dadurch wurde es möglich, die Tetracainwirkung auf die Adenylatzyklase der intakten Fettzelle zu untersuchen, die außerdem, wie oben erwähnt, auch im reduzierten Versuchssystem getestet wurde. Obwohl in beiden Fällen die Rolle der Phosphodiesterase im cAMP-Stoffwechsel nicht berücksichtigt wurde, konnte doch der Einfluß der Lokalanaesthetika auf die cAMP-Synthese ermittelt werden.

6.1. Wirkung von Lokalanaesthetika auf die Lipolyse isolierter Fettzellen

Zunächst sollte die von SIDDLE und HALES (71) und KISSEBAH et. al. (44) beschriebene antilipolytische Wirkung von Lokalanaesthetika untersucht und mit der Insulinwirkung auf die isolierte Fettzelle verglichen werden. Als lipolytische Stimulatoren dienten zwei Substanzen mit unterschiedlicher Wirkungscharakteristik: (a) das β -Rezeptoren stimulierende Katecholamin Isoproterenol und (b) Dibutyryl-cAMP (dBcAMP), ein Derivat des zyklischen Nucleotids, das direkt durch Aktivierung der Proteinkinase lipolytisch wirkt (62). Als Lokalanaesthetikum wurde der potente Lipolysehemmer Tetracain verwendet (71).

10^{-3} M Tetracain hemmt die basale Lipolyse isolierter Fettzellen um 34 % (Tabelle 6.1.). Die durch Isoproterenol (10^{-6} M) maximal stimulierte Lipolyserate isolierter Fettzellen wird durch 10^{-3} M Tetracain signifikant um 47 % reduziert (Tabelle 6.2.).

dBcAMP stimuliert dosisabhängig die Glycerinfreisetzung (Abbildung 6.1.); die durch 1 mM dBcAMP halbmaximale Rate wird durch 10^{-3} M

Tetracain nicht verändert. Bei maximaler Stimulation jedoch (dBCAMP 2 mM und 5 mM) wird die Lipolyse durch Tetracainapplikation (10^{-3} M) auf 46 % bzw. 62 % reduziert.

Wird in einem einzigen Versuchsansatz gleichzeitig die antilipolytische Wirkung von 10^{-3} M Tetracain und Insulin (100 μ E/ml) bestimmt, so fällt auf, daß beide Substanzen die Lipolyserate der inkubierten Fettzellen quantitativ identisch um etwa 40 % hemmen (Tabelle 6.3.).

Bei Erniedrigung der Tetracain-Konzentration auf 10^{-6} M ergibt sich im durch Katecholamine stimulierten System ein der hohen Lokalanaesthetika-Konzentration entgegengesetzter Effekt: Die stimulierte Lipolyse wird signifikant um 22 % erhöht (Tabelle 6.2.). Dieser Effekt ist jedoch wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung, weil er nicht so deutlich ausgeprägt ist wie der hoher Lokalanaesthetika-Dosen. Außerdem experimentierten andere Untersucher, mit denen unsere Ergebnisse verglichen werden sollten, ebenfalls nur mit Lokalanaesthetika-Konzentrationen in der Größenordnung von 10^{-3} M.

Sowohl bei Verwendung von Katecholaminen, wie auch von cAMP-Derivaten (dBCAMP), die über unterschiedliche Mechanismen lipolytisch wirksam sind, hemmt das Lokalanaesthetikum Tetracain (10^{-3} M) die Lipolyse. Da dBCAMP unter Umgehung von cAMP-Spiegelveränderungen lipolytisch wirkt und Tetracain diesen Effekt hemmt, ist anzunehmen, daß die antilipolytische Wirkung durch Angriff auf einen der späteren Schritte zwischen Hormonbindung und Lipaseaktivierung zustande kommt; wahrscheinlich gilt dies auch für die Insulinwirkung. Bemerkenswert ist in diesem Abschnitt ferner die qualitativ und quantitativ identische antilipolytische Wirkung von Lokalanaesthetika und Insulin. Dies sind Hinweise für einen gemeinsamen intrazellulären Vermittler (siehe Kapitel 8., Diskussion).

6.2. Wirkung von Lokalanaesthetika auf die Adenylatzyklase

In diesem Abschnitt wurde zunächst die Lokalanaesthetikawirkung auf die Adenylatzyklase-Aktivität charakterisiert, um sie mit der Insulinwirkung, die unter identischen Versuchsbedingungen von RENNER et. al. (58) untersucht wurde, vergleichen zu können.

Tabelle: 6.1.

Wirkung von Tetracain auf die basale Lipolyserate

Isolierte Fettzellen wurden 60 Minuten in TRIS-Albumin-Puffer enthaltenden Einzelproben inkubiert und die Lipolyse (a) ohne Zusätze und (b) unter Tetracain-Zugabe ($10^{-3}M$) bestimmt.

Meßwerte: Glycerin ($nMol/10^5$ Zellen x 60 Minuten)

Zusätze zum Inkub.-Medium Glycerin ($nMol/10^5$ Z. x 60 Min.)

keine 20,5

Tetracain $10^{-3}M$ 13,6

Tabelle: 6.2.

Einfluß von Tetracain auf die stimulierte Lipolyse isolierter Fettzellen

Die Glycerinproduktion isolierter Fettzellen wurde nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten in TRIS-Albumin-Puffer bestimmt.

Inkubationsmethode: Einzelproben

Anzahl der Versuche: n = 5

Meßwerte: Glycerin $nMol/10^5$ Zellen x 60 Minuten

Zusätze zur MW. $\pm$ s.e.m.
Fettzellsuspension

keine 15,4 $\pm$ 2,3

Isoproterenol $10^{-6}M$ 342 $\pm$ 13,3

Isoproterenol $10^{-6}M$
+ Tetracain $10^{-3}M$ 180 $\pm$ 31,2

Isoproterenol $10^{-6}M$
+ Tetracain $10^{-6}M$ 417 $\pm$ 39,6

Abbildung 6.1.

Hemmung der Dibutyryl-cAMP stimulierten Lipolyse durch Tetracain

Isolierte Fettzellen wurden ohne Zusätze (Basalwert), Dibutyryl-cAMP (Konzentration siehe unten) bzw. Dibutyryl-cAMP + Tetracain 1 mM enthaltenden Einzelproben zugegeben und die Glycerinfreisetzung nach 60 Minuten Inkubation bestimmt.

TRIS-Albumin-Puffer

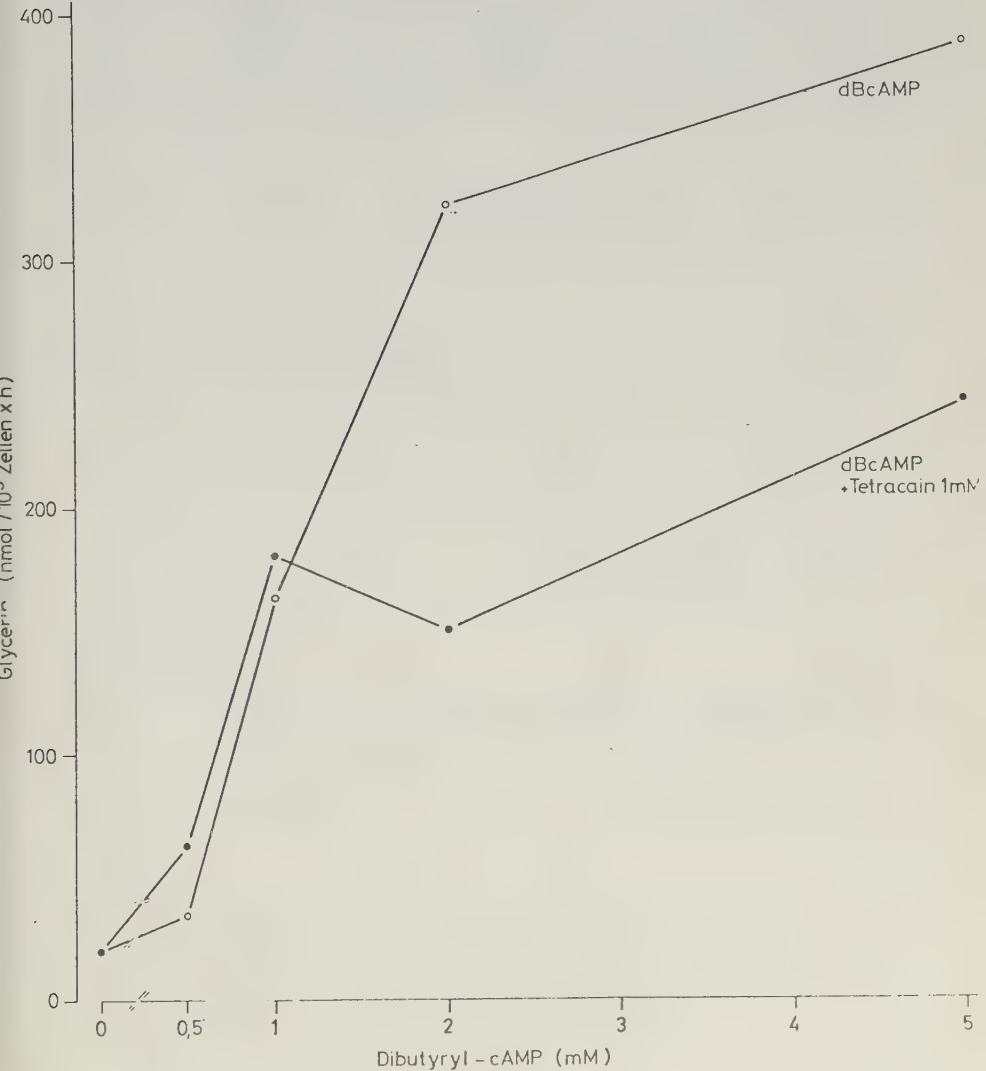


Tabelle 6.3.

Vergleich der antilipolytischen Wirkung von Insulin und Tetracain

In einem Ansatz wurde die Glycerinproduktion unter Basalbedingungen, Zugabe von Isoproterenol 10^{-6} M, von Isoproterenol 10^{-6} M + Tetracain 10^{-3} M oder von Isoproterenol 10^{-6} M + Insulin 100 μ E/ml nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten in TRIS-Albumin-Puffer bestimmt.

Inkubationsmethode: Einzelproben

Meßwerte: Glycerin nMol/ 10^5 Zellen x Stunde

Zusätze zur Fettzellsuspension Glycerinfreisetzung

keine	21
Isoproterenol 10^{-6} M	300
Isoproterenol 10^{-6} M + Tetracain 10^{-3} M	180
Isoproterenol 10^{-6} M + Insulin 100 μ E/ml	182

Tetracain (1 mM) hemmt die Wirkung von Noradrenalin (0,1 mM) auf die Adenylatzyklase-Aktivität von Fettzell-Ghosts um 21 % (Tabelle 6.4.). Lignocain war unter gleichen Versuchsbedingungen mit einer Hemmung von 18 % bei einer Konzentration von 6,4 mM schwächer wirksam. Abbildung 6.2. zeigt die Noradrenalin Dosis-Wirkungs-Kurve auf die Adenylatzyklase von Fettzell-Ghosts. Ab 10^{-6} M steigt sie an, um bei etwa 10^{-4} M Noradrenalin ein Maximum zu erreichen und bei höheren Konzentrationen wieder abzufallen. Auch unter diesen Bedingungen hemmt 1 mM Tetracain die Adenylatzyklase, und zwar über den gesamten Noradrenalin-Dosisbereich gleichmäßig um etwa 30 %.

In einer Fettzell-Plasmamembran-Fraktion wird die mit Noradrenalin (0,1 mM) stimulierte Adenylatzyklase-Aktivität kontinuierlich durch Erhöhung der Tetracainkonzentration gehemmt, beginnend bei etwa 10^{-5} M und maximalem Effekt bei 10^{-2} M Tetracain (Abbildung 6.3.). Im Gegensatz dazu wird die basale und NaF (10^{-2} M) erhöhte Adenylatzyklase bei einer Tetracainkonzentration unter 5 mM nicht erniedrigt; erst über 5 mM Tetracain fällt sie in beiden Fällen abrupt ab. Katecholamine stimulieren die Adenylatzyklase durch Angriff an ihrem Rezeptor, NaF durch direkte Aktivierung der katalytischen Untereinheit der Adenylatzyklase (siehe Kapitel 8.2. und (32)). Daraus und aus den genannten Ergebnissen ist zu folgern, daß Lokalanaesthetika in niedrigen Konzentrationen ähnlich wie Insulin in den Kupplungsprozeß zwischen Katecholaminrezeptor und der katalytischen Untereinheit der Adenylatzyklase eingreifen, während höhere Konzentrationen direkt an der katalytischen Einheit hemmend wirken (Kapitel 8.2.).

Weiter sollte in diesem Abschnitt die (ursächliche) Beziehung zwischen Adenylatzyklase- und Lipolysehemmung durch Lokalanaesthetika untersucht werden. Abbildung 6.4. zeigt die Tetracain-Dosis-Wirkungskurven auf die mit Noradrenalin (0,1 mM) stimulierte Lipolyse der intakten, isolierten Fettzelle und die ebenfalls durch Noradrenalin (0,1 mM) aktivierte Adenylatzyklase-Aktivität von Membranfraktionen.

Beide Parameter werden durch Tetracain dosisabhängig gehemmt. Dies spricht für eine kausale Beziehung zwischen Adenylatzyklase-Hemmung und Antilipolyse, wie sie auch für die Insulinwirkung angenommen wird. Zwar fällt beim Vergleich der Kurven auf, daß die Li-

Tabelle 6.4.

Hemmung der Noradrenalin stimulierten Adenylatzyklase-Aktivität in Fettzell-Ghosts durch Tetracain

Inkubationszeit 10 Minuten

Mittelwerte $\pm$ S.E.M. aus n = 4 Versuchen

Zusätze	Adenylatzyklase-Aktivität (nMol x g Protein ⁻¹ x min ⁻¹)	
keine	83 $\pm$ 7	
Noradrenalin 0,1 mM	595 $\pm$ 68	100%
Noradrenalin 0,1 mM + Tetracain 1 mM	470 $\pm$ 50	79%

p < 0,025, verbundener t-Test

Abbildung 6.2.

Dosis-Wirkungs-Kurve von Noradrenalin auf die Adenylatzyklase-Aktivität in Abwesenheit und Gegenwart von Tetracain (1 mM)

Die Adenylatzyklase-Aktivität von Fettzell-Ghosts wurde bestimmt. Inkubationszeit 10 Minuten

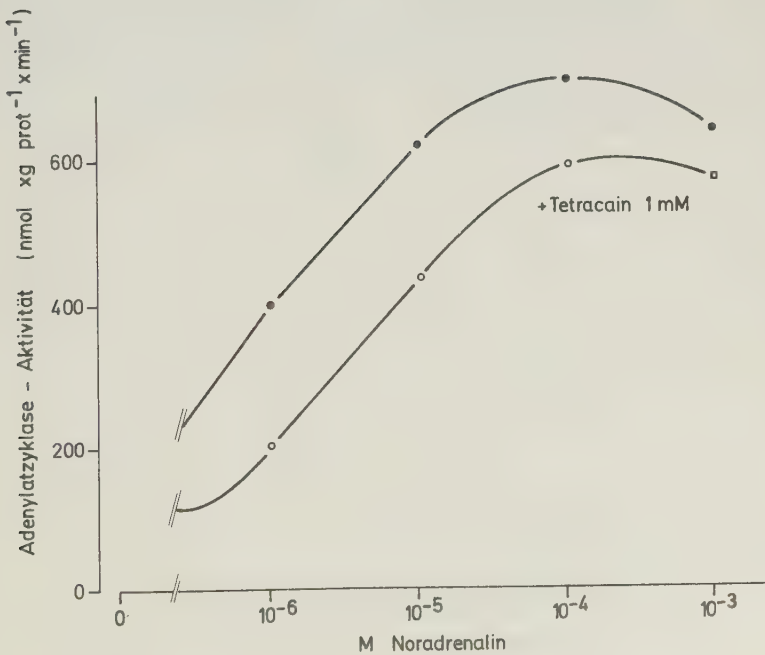


Abbildung 6.3.

Hemmung der basalen, Noradrenalin- und NaF-stimulierten
Adenylatzyklase-Aktivität von Fettzellplasmamembranen
durch Tetracain

Inkubationszeit 10 Minuten

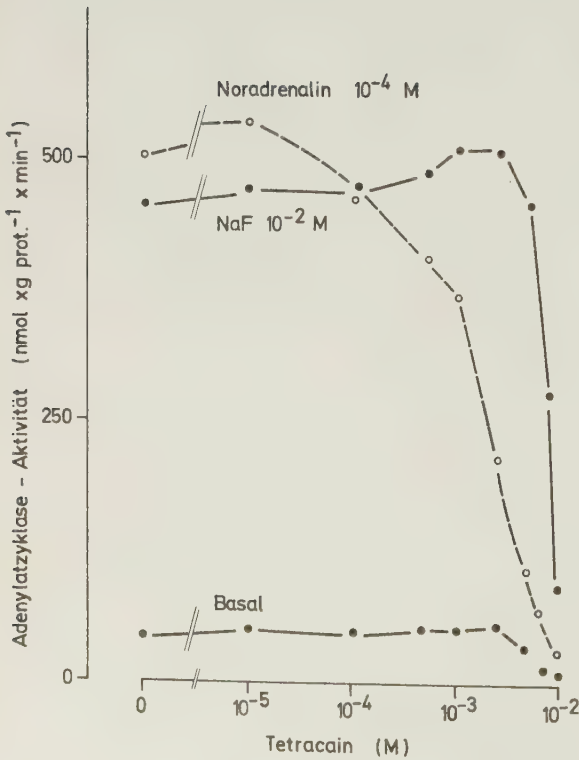


Abbildung 6.4.

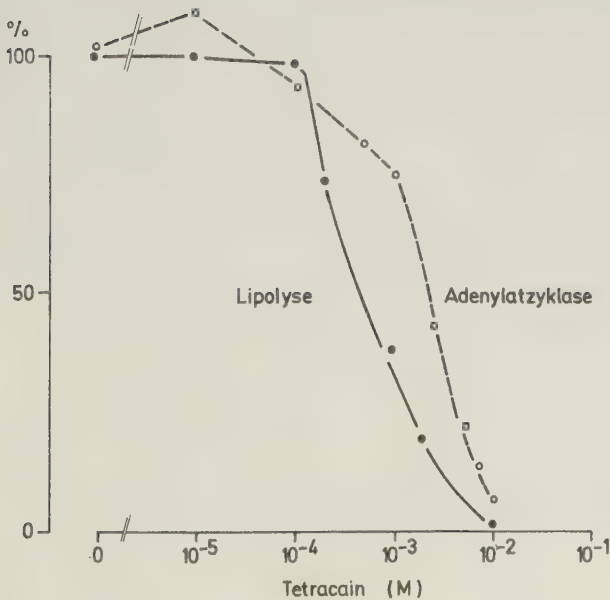
Vergleich der Tetracainwirkung auf die Noradrenalin stimulierte Lipolyse der isolierten Fettzelle und die Adenylatzyklase-Aktivität von Fettzellmembranen

NoradrenalinKonzentration in beiden Ansätzen: $10^{-4}M$

Inkubationszeit der Lipolysebestimmung: 60 Minuten

Inkubationszeit der Adenylatzyklasemessung: 10 Minuten

Die Maximalwerte in Abwesenheit von Tetracain entsprechen 100 %



polyse schon bei 0,6 mM Tetracain um 50 % gehemmt ist, während zur Erniedrigung der Adenylatzyklase-Aktivität um 50 % 2,5 mM Tetracain erforderlich sind. Diese Diskrepanz schließt jedoch eine ursächliche Beziehung nicht aus, denn Membranpräparationen könnten weniger hormonempfindlich sein als intakte Fettzellen (siehe Diskussion).

6.3. Wirkung von Lokalanaesthetika auf die cAMP-Spiegel

In Vorversuchen wurde zunächst festgestellt, daß das Lokalanaesthetikum Tetracain weder den Fettzelltest noch die cAMP-Bestimmung beeinflusst (Daten nicht aufgeführt).

Basale cAMP-Spiegel werden durch Tetracain nur geringfügig verändert (Tabelle 6.5.).

Die Tetracain-Dosis-Wirkungskurve auf die Isoproterenol (10^{-6} M) stimulierten cAMP-Spiegel verläuft biphasisch (Abbildung 6.5. und Tabelle 6.6.): Während 10^{-3} M Tetracain die cAMP-Spiegel signifikant auf 181 % erhöht (Isoproterenolstimulation = 100 %), hemmen niedrige Tetracain-Konzentrationen zwischen 10^{-6} und 10^{-5} den Anstieg des zyklischen Nucleotids signifikant (10^{-6} M Tetracain = 72 %, Tabelle 6.6.). Bemerkenswert ist also wieder die konzentrationsabhängige Umkehr der Tetracainwirkung, ähnlich der Umkehr des Effektes auf die Lipolyse (Kapitel 6.1.). Auch hier ist eine wesentlich ausgeprägtere Wirkungsquantität hoher Lokalanaesthetika-Mengen zu erkennen. Andere Studien (44, 71), mit denen unsere Ergebnisse verglichen werden sollten, verwendeten ebenfalls Lokalanaesthetika-Konzentrationen in der Größenordnung von 10^{-3} M, so daß dieser Bereich als der aussagekräftigere erscheint. Auf die Interpretation der Diskrepanz zwischen Lipolysehemmung und cAMP-Anstieg durch Tetracain (10^{-3} M) wird in der Diskussion näher eingegangen.

IBMX ist ein Hemmstoff der Phosphodiesterase. Werden isolierte Fettzellen damit versetzt, hemmt er den cAMP-Abbau durch dieses Enzym. Auch in IBMX-Gegenwart (2 mM, maximal wirksame Konzentration nach 27) erhöht Tetracain (10^{-3} M) die cAMP-Spiegel Katecholamin-stimulierter Fettzellen (Tabelle 6.7.). Unter der Voraussetzung einer vollständigen Phosphodiesterase-Blockade bedeutet der cAMP-Anstieg in der Fettzelle eine Erhöhung der cAMP-Synthese und

somit eine gesteigerte Adenylatzyklase-Aktivität durch Tetracain. Diese Stimulation steht jedoch im Gegensatz zur Hemmung der Adenylatzyklase im zellfreien Versuchssystem (Abschnitt 6.2.). Auch diese Unstimmigkeit wird in der Diskussion erörtert.

Tabelle 6.5.

Wirkung von Tetracain auf die cAMP-Spiegel

Isolierte Fettzellen wurden 5 Minuten in TRIS-Albumin-Puffer enthaltenden Einzelproben in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von Tetracain 10^{-3}M oder 10^{-6}M inkubiert.

Angabe der Meßwerte in cAMP pmol/ 10^5 Zellen

Zusätze zum Inkubationsmedium	Experiment I	Experiment II
keine	1,5	3,1
Tetracain 10^{-6}M		3,8
Tetracain 10^{-3}M	2,2	

Abbildung 6.5.

Wirkung von Tetracain auf die cAMP-Spiegel isolierter Fettzellen in Gegenwart von Isoproterenol (10^{-6}M) ohne (geschlossene Kreise) und mit (offene Kreise) IBMX (2 mM)

Mittelwerte von 4 Versuchen $\pm$ S.E.M.

Isoproterenol allein entspricht 100 % bzw. $27,0 \pm 1,8$ pmol cAMP/ 10^5 Zellen nach 5 Minuten Inkubation.

Basalwerte: $3,0 \pm 0,4$ pmol/ 10^5 Zellen nach 5 Minuten Inkubation.

Die Hemmung durch Tetracain 10^{-6}M und die Stimulation durch Tetracain 10^{-3} in Abwesenheit von IBMX waren signifikant ($p < 0,005$, Paarvergleich).

TRIS-Albumin-Puffer; Inkubationsmethode: Einzelproben

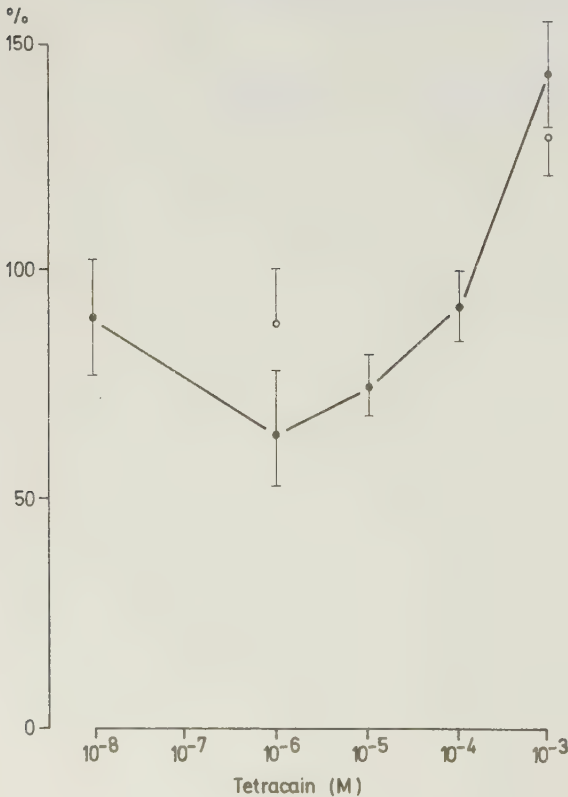


Tabelle: 6.6.

Einfluß von Tetracain auf die durch Isoproterenol stimulierten cAMP-Spiegel

Die cAMP-Spiegel isolierter Fettzellen wurden unter Basalbedingungen, Isoproterenol ($10^{-6}M$), Isoproterenol ($10^{-6}M$) + Tetracain ($10^{-3}M$) und Isoproterenol ($10^{-6}M$) + Tetracain ($10^{-6}M$) nach 5 Minuten Inkubation in TRIS-Albumin-Puffer bestimmt.

Inkubationsmethode: Einzelproben

Meßwerte: pmol cAMP/ 10^5 Zellen bzw. in %, wobei
Isoproterenol (10^{-6}) = 100%

Zusätze zur Fettezell- suspension	pmol cAMP/ 10^5 Zellen MW $\pm$ s.e.m.	p	% MW $\pm$ s.e.m.	p	n
keine	2,4 $\pm$ 0,45		16% $\pm$ 3,8%		8
Isoprot. ($10^{-6}M$)	17,1 $\pm$ 3,50		100%		8
Isoprot. ($10^{-6}M$) + Tetracain ($10^{-3}M$)	33,0 $\pm$ 8,91	0,0125	181% $\pm$ 20%	0,0025	8
Isoprot. ($10^{-6}M$) + Tetracain ($10^{-6}M$)	15,3 $\pm$ 3,46	0,01	72% $\pm$ 8%	0,005	7

Tabelle: 6.7.

cAMP-Bildung bei Phosphodiesterase-Hemmung durch IBMX in Gegenwart von Isoproterenol und Tetracain

Isolierte Fettzellen wurden in Einzelproben 5 Minuten in Gegenwart der angegebenen Zusätze in TRIS-Albumin-Puffer inkubiert. Anzahl der Experimente: $n = 3$
 Meßwerte: cAMP pmol/ 10^5 Zellen

Zusätze zum Inkubationsmedium	MW $\pm$ s.e.m.
keine	3,0 $\pm$ 0,74
Isoproterenol 10^{-6} M	24,5 $\pm$ 1,31
IBMX 2 mM	84,5 $\pm$ 23,51
Isoproterenol 10^{-6} M IBMX 2 mM	568,0 $\pm$ 67
Isoproterenol 10^{-6} M IBMX 2 mM Tetracain 10^{-3} M	736,0 $\pm$ 62

7. Bedeutung extrazellulärer Calcium-Ionen bei der Wirkung von Lokalanaesthetika

Wie im vorhergehenden Abschnitt dieser Arbeit gezeigt wurde, wirken Lokalanaesthetika in hoher Konzentration antilipolytisch, erhöhen aber die cAMP-Spiegel isolierter Fettzellen. Insulin ist ebenfalls antilipolytisch aktiv, senkt dagegen aber die cAMP-Spiegel (Kapitel 4.1.). Diese Ergebnisse unterstützen die Zweifel an der Bedeutung des zyklischen Nucleotids im Mechanismus der Antilipolyse bzw. fördern die Hypothese, daß Calcium der intrazelluläre Bote der Insulinwirkung ist. Nach KISSEBAH et. al. (43) wäre ein Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration der zentrale Mechanismus der Insulin- und Lokalanaesthetikawirkung.

Erneut drängt sich die Frage auf, ob die dafür benötigten Kationen aus dem Extrazellulärraum in die Zelle aufgenommen werden. Obwohl schon in Kapitel 5 gezeigt wurde, daß die Insulinwirkung auf die Lipolyse und cAMP von extrazellulärem Calcium nur unwesentlich beeinflusst wird, wurde in diesem Abschnitt untersucht, ob die Lokalanaesthetikawirkung besonders im Hinblick auf ihre Interferenz mit Calcium-Ionen (59) ebenfalls von diesen Ionen im Inkubationsmedium unabhängig ist. Als Calcium-haltiges Medium wurde dazu ein KREBS-RINGER-HEPES-Albumin-Puffersystem ($\text{CaCl}_2 = 2,5 \text{ mM}$) verwendet und als Calcium-freies ein TRIS-Albumin-Puffer (siehe Kapitel 3.1.).

Werden die Lipolyseraten isolierter Fettzellen in Ca^{++} -haltigem und Ca^{++} -freiem Inkubationsmedium unter im übrigen identischen Versuchsbedingungen gemessen, senkt Tetracain 10^{-3} M in beiden die durch Isoproterenol (10^{-6} M) stimulierte Lipolyse um etwa 45 % (Tabelle 7.1.). Auch die Erhöhung der Katecholamin stimulierten Lipolyse durch niedrige Tetracainmengen (10^{-6} M) um etwa 25 % in beiden Puffersystemen ist von extrazellulären Calcium-Ionen unabhängig (Tabelle 7.1.).

Wie bei der Lipolyse sind auch die Veränderungen der cAMP-Spiegel durch Lokalanaesthetika von Calcium-Ionen im Inkubationsmedium weitgehend unabhängig (Tabelle 7.2.); während Tetracain 10^{-3} M in Ca^{++} -haltigem und Ca^{++} -freiem Puffersystem die stimu-

lierten cAMP-Spiegel deutlich erhöht, werden diese durch Tetracain $10^{-6}M$ in beiden Medien gehemmt. Sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit extrazellulären Calciums erhöht $10^{-3}M$ Tetracain die cAMP-Bildung bei Phosphodiesterasehemmung (IBMX 2 mM) und maximaler Isoproterenolstimulation ($10^{-6}M$) (Tabelle 7.3.).

Entsprechend der Insulinwirkung ist also auch die Wirkung des Lokalanaesthetikums Tetracain auf die Lipolyse und die cAMP-Spiegel isolierter Fettzellen aufgrund vorliegender Daten von Calcium-Ionen im Inkubationsmedium weitgehend unabhängig. Führen Lokalanaesthetika und Insulin zu einer Erhöhung der zytosolischen Calcium-Konzentration, so ist anzunehmen, daß die dafür erforderlichen Kationen nicht aus dem Extrazellulärraum in die Zelle aufgenommen werden, sondern an intrazelluläre Strukturen gebundenes Calcium ins Zytosol diffundiert und dadurch die Calcium-Konzentration im Zytoplasma ansteigt (siehe Diskussion).

Tabelle 7.1.

Vergleich der Lipolyseraten in Ca^{++} -haltigem und Ca^{++} -freiem Inkubationsmedium unter der Wirkung von Lokalanaesthetika

Die Glycerinabgabe ins Medium wurde nach 60 Minuten Inkubation bestimmt.

Inkubationsmethode: Einzelproben

Meßwerte: Glycerin $\text{nMol}/10^5 \text{ Zellen} \times 60 \text{ Minuten}$

Zusätze zur Fettzellsuspension	HEPES-Albumin- Medium $\text{CaCl}_2 = 2,5 \text{ mM}$ $n = 1$	TRIS-Albumin- Medium ohne Ca^{++} $\text{MW} \pm \text{s.e.m.}$ $n = 5$
keine	14,2	$15,4 \pm 2,3$
Isoproterenol 10^{-6} M	357	$342 \pm 13,3$
Isoproterenol 10^{-6} M + Tetracain 10^{-3} M	204	$180 \pm 31,2$
Isoproterenol 10^{-6} M + Tetracain 10^{-6} M	452	$417 \pm 39,6$

Tabelle 7.2.

Vergleich der Tetracainwirkung auf die stimulierten cAMP-Spiegel in Calcium-haltigem und Calcium-freiem Inkubationsmedium

Die cAMP-Spiegel isolierter Fettzellen wurden nach 5 Minuten Inkubation in Calcium-haltigem HEPES-Albumin-Puffer oder Calcium-freiem TRIS-Albumin-Puffer gemessen.

Inkubationsmethode: Einzelproben

Meßwerte: %, Isoproterenol 10^{-6}M = 100 %

Zusätze zum Inkubationsmedium	HEPES-Albumin- Medium (CaCl_2 2,5mM) n = 1	TRIS-Albumin-Medium (ohne Ca^{++})	
		MW $\pm$ s.e.m.	n =
Isoproterenol 10^{-6}M	100 %	100 %	8
Isoproterenol 10^{-6}M + Tetracain 10^{-3}M	261 %	181 % $\pm$ 20%	8
Isoproterenol 10^{-6}M + Tetracain 10^{-6}M	82 %	72 % $\pm$ 8%	8

Tabelle 7.3.

Einfluß von Lokalanaesthetika auf die cAMP-Bildung bei Phosphodiesterasehemmung in Ca^{++} -haltigem und Ca^{++} -freiem Puffer

Isolierte Fettzellen wurden 5 Minuten in Einzelproben inkubiert.
 Meßwerte: cAMP pmol/ 10^5 Zellen

Zusätze zum Inkubationsmedium	HEPES-Albumin-Puffer $\text{CaCl}_2 = 2,5 \text{ mM}$ $n = 1$	TRIS-Albumin-Puffer ohne Ca^{++} M.W. $\pm$ s.e.m. $n = 3$
keine	5,1	$3,0 \pm 0,74$
Isoproterenol 10^{-6} M	139	$25,5 \pm 1,31$
IBMX 2 mM	43,7	$84,5 \pm 23,51$
Isoproterenol 10^{-6} M + IBMX 2 mM	1025	568 ± 67
Isoproterenol 10^{-6} M + IBMX 2 mM + Tetracain 10^{-3} M	1433	736 ± 62

8. Diskussion

8.1. Kompartimentierung von cAMP

Im Lipolysemechanismus der Fettzelle gilt heute folgende Ursachen-Wirkungskette als gesichert (73): Lipolytischer Hormonreiz, Aktivierung der Adenylatzyklase, Anstieg der Spiegel des zyklischen Nucleotids, Aktivierung der Proteinkinase, Phosphorylierung bzw. Aktivierung der Triglyceridlipase (= Hormonsensitive Lipase), Glycerin- und Fettsäurenfreisetzung. Die in diese Reaktionskette eingeschlossene Proteinkinase, das Zielenzym des cAMP, wird nach BROSTROM (4) wie folgt aktiviert: Die Proteinkinase besteht aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit. Sind beide miteinander verbunden, ist dieses Enzym inaktiv. cAMP wird an die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase gebunden und führt dadurch zur Freisetzung der aktiven, katalytischen Einheit, welche die Triglyceridlipase phosphoryliert (siehe auch Abbildung 1.1.). Unter der Voraussetzung, daß das gesamte intrazelluläre und in dieser Arbeit gemessene cAMP im Gleichgewicht mit der Proteinkinase und somit der Lipolyse steht, müßte die Höhe der cAMP-Spiegel mit der Höhe der Glycerinfreisetzung über einen bestimmten Bereich korrelieren. Dies trifft jedoch oft nicht zu.

Unter verschiedenen Bedingungen dieser Arbeit konnte nur eine mangelnde Korrelation zwischen cAMP und Lipolyse beobachtet werden. Während die Lipolyse durch Isoproterenol ($10^{-8}M$) nahezu maximal aktiviert wird, steigen die cAMP-Spiegel unproportional nur um etwa 20 % an (Abb. 4.3.). $10^{-3}M$ Tetracain hemmt die stimulierte Lipolyse während die cAMP-Spiegel weiter erhöht werden (Tabelle 6.2.); bei niedriger Tetracainkonzentration ($10^{-6}M$) ergeben sich entgegengesetzte Effekte: cAMP-Senkung und Lipolysestimulation (Tabelle 6.2.).

Auch aus der Literatur sind ähnliche Unstimmigkeiten bekannt. Während die durch Katecholamine stimulierte Glycerinfreisetzung über 15 Minuten linear ansteigt, fallen die cAMP-Spiegel nach einem initialen Anstieg wieder ab (HEPP et. al., 32). SIDDLE et. al. (70) und CORBIN et. al. (9) beobachten eine unverhältnismäßige Erniedrigung stimulierter cAMP-Spiegel durch Insulin im Vergleich zur Lipolysehemmung. Die basale, auf die Wasserphase der Fettzelle umgerechnete cAMP-Konzentration wäre schon

zur vollständigen Aktivierung der Proteinkinase ausreichend, entsprechend den im zellfreien System ermittelten Eigenschaften dieses Enzyms (10, 54, 62).

Eine Interpretation aller erwähnten Diskrepanzen zwischen der Höhe der cAMP-Spiegel und der Lipolyserate wäre die Kompartimentierung des zyklischen Nucleotids. Ähnlich der perfundierten Leber (16) könnte auch in der Fettzelle nur ein kleiner Teil des gesamten intrazellulären und in die Messungen eingehenden cAMP metabolisch aktiv sein und die Lipolyserate steuern (9, 53, 70). Geringfügige Veränderungen dieses aktiven Pools steuern die Proteinkinase-Aktivität. Daneben existiert gleichzeitig ein größerer, metabolisch nicht aktiver und möglicherweise an Zellstrukturen gebundener cAMP-Pool, der ebenfalls in die cAMP-Bestimmungen eingeht und Veränderungen im regulatorischen Kompartiment verdecken kann. Veränderungen des gesamten cAMP sagen dann wenig über Veränderungen im die Lipolyse regulierenden Pool aus. Eine genauere Charakterisierung der verschiedenen cAMP enthaltenden Kompartimente ist leider bisher nicht bekannt.

Zusammenfassend muß also die Rolle des gesamten, intrazellulären cAMP als Vermittler der Lipolyse-regulation in Frage gestellt werden. Unsere Daten lassen sich jedoch unter der Annahme der Verteilung auf regulatorisch aktive und nicht aktive Kompartimente erklären. Ob daneben noch andere Mechanismen wie z. B. Calcium-Ionen die Lipolyse steuern, wird in weiteren Kapiteln dieser Diskussion erörtert.

8.2. Tetracain- und Insulinwirkung auf die Adenylatzyklase

Insulin erniedrigt die durch lipolytische Hormone stimulierten cAMP-Spiegel isolierter Fettzellen (Kapitel 4.1., (6, 50, 70)). Dieser Effekt auf den cAMP-Stoffwechsel könnte durch eine Hemmung der Synthese an der Adenylatzyklase, eine gesteigerte Hydrolyse durch die Phosphodiesterase oder eine Insulinwirkung auf beide den cAMP-Umsatz regulierenden Enzyme zustandekommen.

Auf die Adenylatzyklase wurde im zellfreien Versuchssystem ein Antagonismus zwischen lipolytischen Hormonen und Insulin nachgewiesen (33), auf den unten näher eingegangen wird. LOTEN und SNEYD

(49) und andere Gruppen (76, 78) beobachteten eine Aktivierung der Phosphodiesterase durch Vorbehandlung intakter, isolierter Fettzellen mit Insulin. Im zellfreien Versuchssystem war jedoch kein direkter Effekt des Insulins nachweisbar. Außerdem wurde an der intakten Zelle gezeigt, daß auch lipolytische Hormone die Aktivität dieses Enzyms steigern (78). Angesichts dieser Daten wurde die Bedeutung der Phosphodiesterase für den cAMP senkenden Insulineffekt in Frage gestellt. Eine neuere Untersuchung mit intakten Fettzellen spricht jedoch dafür, daß sich der Insulineffekt sowohl aus einer Hemmung der Adenylatzyklase als auch einer Aktivierung der Phosphodiesterase zusammensetzt (HÄRING et. al. 1976, 27).

Weitgehend anerkannt ist heute die Bedeutung der Adenylatzyklase für die Lipolyseregulation (32). Parallele, hemmende Insulinwirkungen auf die durch Katecholamine stimulierte Adenylatzyklase-Aktivität im reduzierten Versuchssystem sowie auf die Lipolyse und die cAMP-Spiegel in der intakten Zelle mit einer paradoxen Umkehr des Insulineffektes in allen drei Parametern weisen darauf hin, daß die Adenylatzyklase in der Tat ein wichtiger Kontrollpunkt in der Regulation der Antilipolyse durch Insulin ist (HEPP et. al. 1976 (32)). Von TORRES et. al. (74) und RENNER et. al. (58) wurden die Eigenschaften dieses membrangebundenen Enzyms genau charakterisiert. Insulin hemmt die durch Katecholamine stimulierte Adenylatzyklase von Fettzell-Ghosts im Gegensatz zur unveränderten basalen und NaF aktivierten Adenylatzyklase (58). Dieses Enzym der Fettzelle besteht aus Katecholaminrezeptor und katalytischer Einheit, die beide durch einen Kupplungsprozeß miteinander verbunden sind (Abbildung 8.1., (32)). Katecholamine stimulieren ihren Rezeptor, NaF wirkt direkt auf die katalytische Einheit aktivierend. Die Hemmung der Adenylatzyklase bedeutet einen Eingriff des Insulins in den Kupplungsprozeß (58).

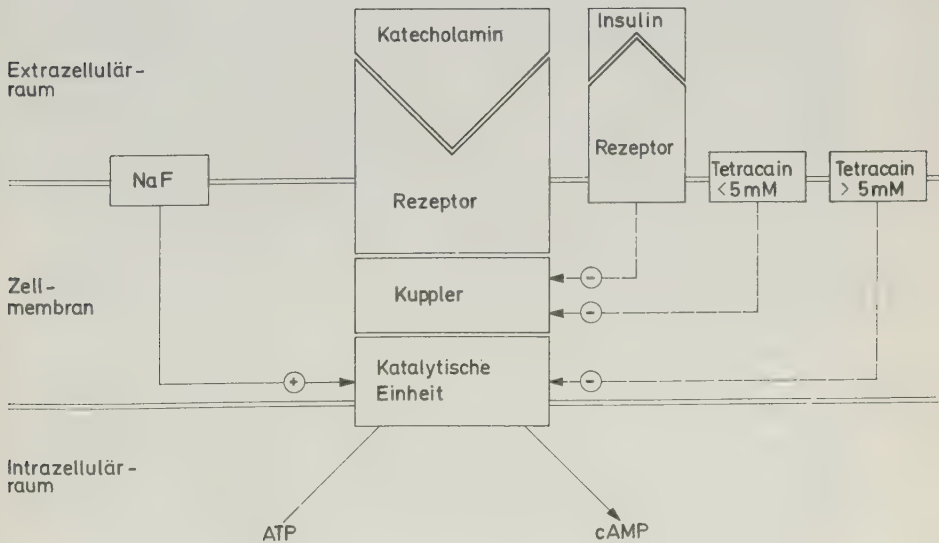
Im Hinblick auf die fundamentale Rolle der Adenylatzyklase-Hemmung durch Insulin für die Antilipolyse wurde in dieser Arbeit die Wirkung des Lokalanaesthetikums Tetracain auf die Adenylatzyklase untersucht; wichtig war die Frage, ob der antilipolytische Tetracaineffekt auf die isolierte Fettzelle (Kapitel 6.1.) auch gleichzeitig mit einer Adenylatzyklase-Hemmung im reduzierten System verbunden ist (Kapitel 6.2.). Wie Insulin hemmt auch Tetracain ($10^{-3}M$) die Katecholamin-stimulierte Adenylatzyklase-Aktivität von Fett-

Abbildung: 8.1.

Modell des Adenylatzyklesystems der Fettzellmembran

Die Angaben beziehen sich auf Ergebnisse im reduzierten Versuchssystem.

Erklärung im Text (Kapitel 8.2.)



zell-Ghosts. Die basale und NaF erhöhte Aktivität wird durch das Lokalanaesthetikum über einen breiten Konzentrationsbereich nicht gehemmt; erst sehr hohe Lokalanaesthetikamengen hemmen die basale und durch NaF stimulierte Adenylatzykase. Annähernd parallel zur Adenylatzykase wird auch die Lipolyse reduziert. Nach diesen Ergebnissen greifen Lokalanaesthetika wie Insulin in den Kupplungsprozeß zwischen Rezeptor und katalytischer Einheit der Adenylatzykase ein; erst sehr hohe Tetracain-Konzentrationen hemmen direkt die katalytische Einheit.

Identische Versuchsbedingungen dieser Arbeit und der Studie von RENNER et. al. (58) erlauben einen Vergleich der Ergebnisse. Obwohl die Daten nicht in jedem Detail übereinstimmen, ist die Hemmung der durch Katecholamine stimulierten Adenylatzykase im Gegensatz zur unbeeinflussten basalen und NaF Aktivität sowohl durch Lokalanaesthetika wie auch Insulin nicht zu übersehen. Beide Substanzen interferieren mit dem Kupplungsprozeß zwischen Rezeptor und katalytischer Einheit der Adenylatzykase (Abbildung 8.1.) und hemmen die Lipolyse. Dies ist ein weiteres Argument für die ursächliche Bedeutung der Adenylatzykase-Hemmung im reduzierten Versuchssystem für die Hemmung der Lipolyse in der intakten Zelle.

Die Lokalanaesthetikawirkung ist also eine Bestätigung für die Annahme einer fundamentalen physiologischen Rolle des Adenylatzykase-Systems im Mechanismus der Insulinwirkung (32, 58). Die Adenylatzykase muß als primäres Ziel des Insulins betrachtet werden. Dies schließt cAMP als 'second messenger' ein, ob der einzige, ist ungewiß. Eine Interpretation der entgegengesetzten Wirkungen der Lokalanaesthetika und des Insulins auf die cAMP-Spiegel wäre die Kompartimentierung des zyklischen Nucleotids (Kapitel 8.1.). Andererseits könnten Veränderungen der Adenylatzykase-Aktivität in der Plasmamembran der Hormonwirkung auf die Calcium-Verteilung vorausgehen (Kapitel 8.8. - 8.10.).

8.3. Lokalanaesthetika und Katecholamin-stimulierte cAMP-Spiegel

10^{-3} M Tetracain erhöht Katecholamin-stimulierte cAMP-Spiegel signifikant (Kapitel 6.3.). Zwar beobachteten KISSEBAH et. al. (44) keine Veränderung der cAMP-Spiegel durch Lokalanaesthetika, dagegen berichten SIDDLE und HALES (71) in Übereinstimmung mit den

Ergebnissen dieser Arbeit von einer dosisabhängigen Erhöhung Adrenalin-stimulierter cAMP-Spiegel durch das Lokalanaesthetikum Dibucain.

Ausgehend von der offensichtlichen Stimulation der Spiegel des zyklischen Nucleotids durch Lokalanaesthetika stellt sich die Frage, über welchen Mechanismus dieser Effekt zustande kommt. Dafür gibt es theoretisch drei Möglichkeiten: (a) die Veränderung der cAMP-Synthese durch die Adenylatzyklase, (b) Eingriff der Lokalanaesthetika am cAMP-Abbau durch die Phosphodiesterase und (c) durch gleichzeitige Aktivitätsänderung beider Enzyme. Erstere Möglichkeit wurde in dieser Arbeit näher studiert.

Zur Untersuchung der Tetracainwirkung auf die cAMP-Synthese wurde isolierten Fettzellen das Methylxanthin IBMX zugegeben, welches den cAMP-Abbau durch die Phosphodiesterase hemmt (29, 62). Dabei führt Tetracain ($10^{-3}M$) in Gegenwart von Isoproterenol und IBMX zu einer weiteren Erhöhung der cAMP-Spiegel (Kapitel 6.3.). Vorausgesetzt, IBMX blockiert die membrangebundene Phosphodiesterase ("low K_M -Phosphodiesterase") und die zytosolische, "high- K_M -Phosphodiesterase" vollständig, bedeutet dies, daß Lokalanaesthetika zusätzlich zu Katecholaminen die Adenylatzyklase stimulieren. Dieser im komplexen System der intakten Zelle gefundene Tetracaineffekt auf die Adenylatzyklase steht jedoch im Gegensatz zu dem im reduzierten Versuchssystem beobachteten (Kapitel 6.2.). Tetracain ($10^{-3}M$) reduziert hier die durch Katecholamine stimulierte Adenylatzyklase-Aktivität.

Welcher dieser beiden Effekte auf die Adenylatzyklase für die Erhöhung Katecholamin-stimulierter cAMP-Spiegel in der intakten Zelle durch Lokalanaesthetika relevant ist, ist schwierig abzuschätzen. In einem Fall wird die Integrität der Fettzelle, ihrer Membranen und ihres Energiestoffwechsels zerstört. Im anderen ist zwar die Zellmembran und der Stoffwechsel weitgehend intakt, doch ist es fraglich, ob tatsächlich eine vollständige Blockierung der Phosphodiesterase vorliegt. Weiterhin müßte die Rolle der Phosphodiesterase bei der Erhöhung der cAMP-Spiegel durch Lokalanaesthetika genau untersucht werden. Denn weder im reduzierten Versuchssystem, noch in der intakten Zelle wird ihre Bedeutung für den cAMP-Stoffwechsel berücksichtigt.

8.4. Lokalanaesthetika und die Lipolyse

Lokalanaesthetika ($10^{-3}M$) hemmen die Katecholamin und die Dibutyryl-cAMP (dBcAMP) induzierte Lipolyse isolierter Fettzellen; bemerkenswert ist die qualitativ und quantitativ identisch ausgeprägte Hemmung durch Lokalanaesthetika und Insulin (Kapitel 6.1.). Während Lokalanaesthetika jedoch die cAMP-Spiegel erhöhen, werden diese durch Insulin erniedrigt (Kapitel 4.1. und 6.3.).

Unsere Daten stimmen weitgehend mit Ergebnissen anderer Studien überein. Verschiedene Lokalanaesthetika (10^{-4} - $10^{-2}M$) hemmen nach SIDDLE und HALES (71) die Adrenalin induzierte Lipolyse isolierter Fettzellen der Ratte. Procain (10^{-3}), ebenfalls ein Lokalanaesthetikum, hemmt die basale und die durch Adrenalin ($10^{-6}M$) stimulierte Lipolyse wie auch Insulin antilipolytisch wirksam ist (KISSEBAH et. al. (44)). Auch bei der Lipolysesteigerung durch Theophyllin und dBcAMP hemmt das Lokalanaesthetikum Dibucain (0,25 mM) die Lipolyse (71). Gleichzeitig werden bei SIDDLE und HALES (71) die durch Katecholamine stimulierten cAMP-Spiegel konzentrationsabhängig durch Dibucain erhöht; Procain verändert dagegen die cAMP-Konzentration nicht (44). Offensichtlich ist also die Lipolysehemmung durch Lokalanaesthetika und Insulin bei uneinheitlichen Wirkungen beider Substanzen auf die cAMP-Spiegel.

Wiederum stellt sich die zentrale Frage dieser Arbeit, über welchen intrazellulären Mechanismus die Antilipolyse vermittelt wird.

Ein Argument gegen die Bedeutung des gesamten, intrazellulären cAMP als 'second messenger' der Lipolysehemmung ist die mangelnde Korrelation zwischen der Lipolysehemmung durch Lokalanaesthetika und Insulin einerseits, und der unterschiedliche Effekt beider Substanzen auf die cAMP-Spiegel andererseits. Diese Diskrepanz läßt sich jedoch unter der Annahme einer Kompartimentierung des gesamten zyklischen Nucleotids in metabolisch aktive und inaktive Pools erklären. (siehe Kapitel 8.1.). Weiterhin könnten Lokalanaesthetika die cAMP-Bindung an die Proteinkinase entkoppeln. Dann steigt zwar, durch das Lokalanaesthetikum bedingt, die ge-

samte cAMP-Konzentration der Zelle, die auch im Gleichgewicht mit der Proteinkinase steht, andererseits aber vermindern die Lokalanaesthetika die Affinität der Proteinkinase gegen cAMP. Zusammenfassend kann cAMP somit nach wie vor als ein Vermittler der Antilipolyse betrachtet werden.

Katecholamine erhöhen die Lipolyse durch Stimulation der cAMP-Spiegel. Theophyllin, ein Methylxanthin, blockiert den cAMP-Abbau durch seine Hemmung der Phosphodiesterase. dBcAMP, ein Derivat des zyklischen Nucleotids, stimuliert die Lipolyse durch direkte Aktivierung der Proteinkinase (62). In Gegenwart jeder dieser drei über unterschiedliche Mechanismen lipolytisch wirksamer Substanzen hemmen Lokalanaesthetika die Lipolyse. Dies und die Tatsache, daß dBcAMP unter Umgehung von cAMP-Spiegelveränderungen lipolytisch wirkt (62) und dieser Effekt durch Lokalanaesthetika gehemmt werden kann (Kapitel 6.1. und (16)), ist ein Argument gegen cAMP als 'second messenger' der Antilipolyse bzw. eines für einen cAMP unabhängigen Mechanismus. Dieser müßte in einen oder mehrere der späteren Schritte zwischen Hormonbindung an der Zellmembran und der Lipaseaktivierung eingreifen. Z. B. könnten Calcium-Ionen die Aktivität der Proteinkinase und/oder der Triglyceridlipase und/oder der Phosphatase(n) verändern (Kapitel 8.8.). Der Einfluß der Lokalanaesthetika auf die Calcium-Verteilung (3, 52) und ihre antilipolytische Wirkung bei verschiedenen, besonders auch cAMP unabhängigen lipolytischen Stimuli, ist ein Argument für eine zentrale Funktion des Calciums in der Regulation der Antilipolyse.

8.5. Extrazelluläre Calcium-Ionen und die Regulation der Lipolyse

Auf die Diskussion über die Bedeutung des Calciums für die Lipolyse-regulation wurde wiederholt schon hingewiesen. Die für die Informationsübertragung in der Fettzelle notwendigen Calcium-Ionen könnten aus intrazellulären Depots stammen oder aber aus dem Extrazellulär-raum ins Zytosol aufgenommen werden. Letztere Möglichkeit wurde in dieser Arbeit untersucht. Besonders wichtig war dabei die Frage, ob die antilipolytische Insulin- und Tetracainwirkung von Calcium-Ionen im Inkubationsmedium verändert wird. Eine Abhängigkeit wäre ein Argument für die Hypothese von der Bedeutung der Calcium-Ionen im Mechanismus der Antilipolyse.

Isolierte Fettzellen der Ratte wurden in Calcium-haltigen und Calcium-freien Medien inkubiert, die Lipolyseraten und die cAMP-Spiegel in Abhängigkeit von Katecholamin-, Insulin-, Lokalanaesthetika- und IBMX-Zugabe gemessen (Kapitel 5. und 7.). In allen Versuchen hatten extrazelluläre Calcium-Ionen nur geringfügigen Einfluß auf die Höhe der Lipolyseraten und der cAMP-Spiegel. Sowohl die Katecholaminstimulation, wie auch der antilipolytische und die cAMP-Spiegel senkende Insulineffekt waren weitgehend unabhängig von extrazellulären Calcium-Ionen. Ebenso waren für die Wirkungen des Lokalanaesthetikums Tetracain auf die Lipolyse und die cAMP-Konzentration extrazelluläre Calcium-Ionen von untergeordneter Bedeutung.

Weitgehende Übereinstimmung herrscht diesbezüglich zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und Daten aus der Literatur. Nach HÄRING (26) verändern Calcium-Ionen nicht die cAMP-Spiegel isolierter Fettzellen. Auch der Insulineffekt ist bei Abwesenheit dieses Kations im Medium erhalten. Die Lipolyserate isolierter Fettzellen ist aufgrund einer Studie von FAIN und BUTCHER (17) bei Katecholamin- und Insulinapplikation von extrazellulärem Calcium unabhängig. Bei SCHIMMEL (65) und MOSINGER et. al. (51) beeinflußt Calcium weder den Anstieg von cAMP, noch die Lipolyserate isolierter Fettzellen in Gegenwart maximal wirksamer Adrenalinmengen. Nur bei Verwendung sehr niedriger Hormonkonzentrationen war der Anstieg von cAMP und Lipolyse in Calcium freiem Medium vermindert.

Aus den Daten dieser Arbeit und den erwähnten Studien geht also hervor, daß extrazelluläre Calcium-Ionen die Lipolyserate und die cAMP-Spiegel isolierter Fettzellen nur unwesentlich verändern. Calcium hat weder auf die Insulin-, noch auf die Tetracainwirkung einen deutlichen Einfluß. Obwohl dieser Befund auf den ersten Blick die Bedeutung des Calciums für die Lipolyse regulation nicht unterstützt, kann er trotzdem nicht als Argument gegen eine Funktion dieses Kations im Metabolismus der Fettzelle gewertet werden, besonders in der Antilipolyse durch Lokalanaesthetika und Insulin. Intrazelluläre Calcium-Depots könnten nach Hormonstimuli Ionen ins Zytosol abgeben und dadurch die Aktivität eines oder mehrerer Enzyme der lipolytischen Enzymkaskade verändern. Ein kooperativer Mechanismus zwischen cAMP und Calcium ist nicht ausgeschlossen.

8.6. Insulin und Lokalanaesthetika: Gemeinsamer oder getrennter Rezeptor

Der erste Schritt im Mechanismus der Insulinwirkung ist seine Bindung an spezifische Rezeptoren der Zellmembran (11). Lokalanaesthetika wirken ebenfalls primär auf die Zellmembran (59). In beiden Fällen ist jedoch noch nicht endgültig geklärt, ob alle Effekte nur durch die Wirkung an der Zellmembran zustande kommen (46).

Parallele Wirkungen von Insulin und Lokalanaesthetika in hoher Konzentration auf die Lipolyse (Kapitel 6.1.), die Adenylatzyklase-Aktivität (Kapitel 8.2.) und die Calcium-Verteilung (42) stellen die Frage, ob beide Substanzen ihre metabolischen Wirkungen am gleichen oder an verschiedenen Rezeptoren der Zellmembran auslösen bzw. Insulin und Lokalanaesthetika auf identische oder unterschiedliche Proteine oder Glykoproteine (11) der Zellmembran wirken. KISSEBAH et. al. (42) beobachtete, daß die Vorbehandlung isolierter Fettzellen mit dem proteolytischen Enzym Trypsin die Insulin- im Gegensatz zur Lokalanaesthetikawirkung (Procain) aufhebt. Nach Trypsinbehandlung hemmt Insulin weder die Lipolyse noch die Calcium-Bindung an Fettzell-Ghosts.

Hieraus ist auf einen Einfluß von Insulin und Lokalanaesthetika auf verschiedene Membranbestandteile zu schließen. Der Insulinrezeptor ist also nicht identisch mit dem "Lokalanaesthetikarezeptor".

8.7. Lokalanaesthetika und das Fettgewebe

Lokalanaesthetika sind chemisch verwandte Stoffe, die alle aus einer Aminogruppe, einer verbindenden Zwischengruppe und einem aromatischen Ring aufgebaut sind (59). Sie hemmen die Nervenleitfähigkeit reversibel durch ihre Wirkung auf die Nervenmembran, in der sie die mit der Erregung verbundene Permeabilitätserhöhung von Natrium- und Kalium-Ionen reduzieren (3, 59). Daneben verdrängen Lokalanaesthetika Calcium-Ionen aus ihrer Bindung an natürliche und synthetische Membranen (3, 52). Obwohl ihre Interaktion mit der Nervenmembran allgemein anerkannt ist, sind die durch Lokalanaesthetika hervorgerufenen molekularen Membranver-

Änderungen immer noch umstritten. Z. B. wird eine Änderung der Plasmamembranoberflächenladung und dadurch eine verminderte Kationenleitfähigkeitzunahme diskutiert (59). Nach einer anderen Theorie reagieren Lokalanaesthetika mit spezifischen Rezeptoren der Zellmembraninnenseite (59). Wieder andere Autoren vermuten eine Fluiditätszunahme von Membranphospholipiden und dadurch eine erhöhte molekulare Unordnung. Gleichzeitig werden Calcium-Ionen aus ihrer Membranbindung verdrängt (52).

Neben ihrer Wirkung auf Nerven sind auch Lokalanaesthetika-Effekte auf andere Gewebe beschrieben. So werden Calcium abhängige Vorgänge an der Muskelzelle (20), Nebenniere (39), Leber (21) und der Erythrozytenmembran (47) durch Lokalanaesthetika beeinflusst. Am Fettgewebe hemmen sie parallel zur Lipolyse die Calcium-Bindung an Fettzell-Ghosts (42).

Offensichtlich ist die Lokalanaesthetika-Wirkung auf die Nervenzellmembran. Aus dieser verdrängen sie Calcium-Ionen. Aufgrund des relativ einheitlichen Aufbaus der Säugetierzellmembran ist dieser Mechanismus auch für andere Zelltypen anzunehmen. Dies bestätigt ihr Einfluß auf verschiedene Gewebe. Für das Fettgewebe kann infolgedessen als sicher gelten, daß Lokalanaesthetika ebenfalls vorwiegend auf die Zellmembran wirksam sind und in dieser Calcium-Ionen aus ihrer Bindung verdrängen. Die zelluläre Verteilung dieses Kations wird dadurch verändert.

Die in Fettzell-Ghosts und Plasmamembranpräparationen enthaltene Adenylatzyklase ist in der Zellmembran lokalisiert. Die durch Katecholamine stimulierbare Aktivität wird durch Lokalanaesthetika im zellfreien System gehemmt (Kapitel 6.2.). Aus keiner der oben genannten Hypothesen über den molekularen Wirkungsmechanismus dieser Pharmaka auf die Zellmembran geht jedoch hervor, welche der Hemmung der Adenylatzyklase, genauer ausgedrückt, der Hemmung des Kupplungsprozesses zugrunde liegt.

8.8. Calcium und Fettzellenzyme

Ein Hauptargument für die Rolle des Calciums im Insulinmechanismus ist die Aktivitätsänderung verschiedener Fettzellenzyme durch dieses Kation.

KISSEBAH et. al. (44) beobachteten eine Hemmung von Lipolyserate und Proteinkinase-Aktivität sowohl durch Insulin wie auch durch das Lokalanaesthetikum Procain, die jedoch nur mit einer unverhältnismäßigen (Insulin) bzw. ohne (Procain) Erniedrigung der cAMP-Spiegel verbunden ist. Wegen der zeitlichen und quantitativen Parallelität der Insulin- und Procainwirkung interpretiert KISSEBAH (44) die Reduzierung der Proteinkinase-Aktivität mit nachfolgender Hemmung der Triglyceridlipase als einen Hauptangriffspunkt im Mechanismus der Antilipolyse durch Insulin. Gleichzeitig soll Insulin die Phosphoprotein-Phosphatase(n) aktivieren, die die Lipase durch Dephosphorylierung inaktivieren (Abbildung 1.1. und 8.2., (44)).

Nachdem Insulin und Procain unterschiedliche, der Lipolysehemmung unangemessene Wirkungen auf die cAMP-Konzentration haben, scheidet das zyklische Nucleotid nach KISSEBAH (45) als Vermittler der Antilipolyse aus. Er konnte zeigen, daß Calcium die Aktivität mehrerer aus menschlichem Fettgewebe präparierter Enzyme verändert. Diese Kationen reduzieren die cAMP-Bindung an die Proteinkinase (45), während sie gleichzeitig die Triglyceridlipase durch Stimulation der Phosphatase(n) hemmen. Der Calcium-Mechanismus der verminderten Lipaseaktivierung besteht infolgedessen aus einer reduzierten Phosphorylierung durch die Proteinkinase und einer verstärkten Dephosphorylierung durch die Phosphatase(n).

In die Aktivierung/Inaktivierung der Proteinkinase, dem Schlüsselenzym der Lipolyseregulation, könnten Calcium-Ionen und cAMP im Antagonismus eingreifen (45). Lipolytische Hormone rufen einen cAMP-Anstieg hervor, dem die durch Insulin hervorgerufene intrazelluläre Calcium-Erhöhung entgegenwirkt (8, 42).

Argumente für diese Theorie sind z. B. die mangelhafte Korrelation zwischen Lipolysehemmung und cAMP-Spiegel-Senkung (Kapitel 8.1.) sowie die Wirkung der Lokalanaesthetika, die die zelluläre Calcium-Verteilung beeinflussen (Kapitel 8.7. und 8.9.). Weiter werden andere durch Insulin gesteuerte Enzyme wie die Pyruvat-Dehydrogenase (69) und die Glykogen-Synthetase (36) durch Calcium in ihrer Aktivität reguliert. Gegenargumente sind die mögliche Kompartimentierung des zyklischen Nucleotids (Kapitel 8.1.) und die Wirkung der Lokalanaesthetika auf die Adenylatzyklase (Kapitel 8.2. und 8.3.).

8.9. Modell der Lipolysehemmung durch Calcium

Die Gruppe um KISSEBAH gehört zu den Befürwortern eines alternativen, Calcium vermittelten antilipolytischen Insulinmechanismus. Aus eigenen Daten und Ergebnissen verschiedener Veröffentlichungen entwickelten jene folgendes Modell (43):

Insulin wird an seinen Rezeptor an der Zellmembran gebunden und ruft in dieser eine Konformationsänderung hervor. Dadurch werden Calcium-Ionen aus ihren Bindungsstellen in der Plasmamembran und/oder dem endoplasmatischen Retikulum verdrängt und ins Zytoplasma abgegeben. Gleichzeitig hemmt Insulin den Calcium-Efflux aus der Fettzelle. Beide Vorgänge begünstigen einen Anstieg der zytoplasmatischen Calcium-Spiegel, der als zentraler Vorgang zu werten ist. Intrazelluläre Fettzellenzyme werden durch die Insulin induzierte Veränderung der Calcium-Konzentration im Sinne der Lipolysehemmung in ihrer Aktivität reguliert (Kapitel 8.8., Abbildung 8.2.).

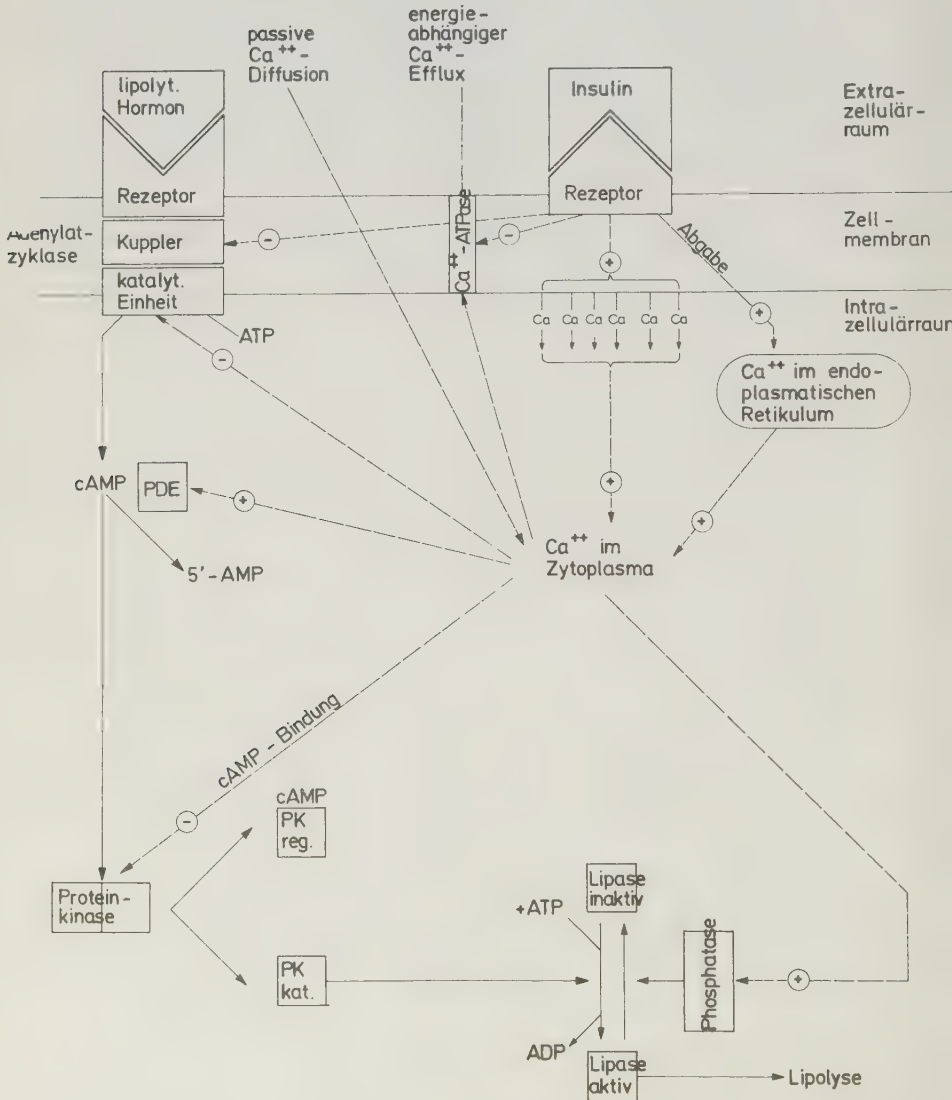
Diese Hypothese ist gegenwärtig noch nicht allgemein anerkannt. Auch in dieser Arbeit finden sich Argumente gegen (Kapitel 8.1., 8.2., 8.4., u. a.) sowie für dieses Modell (z. B. Kapitel 8.7. und 8.8.). Kräftig unterstützt wird es jedoch durch nachfolgende, aus verschiedenen Studien bekannte Fakten:

- a) CLAUSEN et. al. (8) schlagen aufgrund sorgfältiger Experimente eine Erhöhung der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration durch Insulin vor.
- b) Die zytosolische Calcium-Konzentration der Säugetierzelle liegt in der Größenordnung von 10^{-8} und 10^{-5} M (56). Mit etwa 10^{-3} M ist sie in der Extrazellulärflüssigkeit wesentlich höher. Entsprechend diesem Konzentrationsgefälle tritt Calcium passiv in den Intrazellulärraum ein. Zur Aufrechterhaltung der zellulären Calcium-Homöostase verfügt die Zelle über eine Calcium aktivierte Adenosintriphosphatase, die unter Energieverbrauch diese Ionen aus dem Intrazellulärraum pumpt (56). Hormone könnten dieses System regulieren, dadurch die transmembranären Calcium-Ströme beeinflussen und über diesen Mechanismus die zytoplasmatischen Calcium-Spiegel mitbestimmen.

- c) Vom gesamten Calcium der Fettzelle sind etwa 90 % intrazellulär gebunden und nicht mit dem Inkubationsmedium austauschbar (42). Die genaue Funktion dieses Pools ist unklar. Der verbleibende Anteil kann jedoch in Auswaschexperimenten (42) in drei verschiedene Fraktionen differenziert werden, denen KISSEBAH die folgenden morphologischen Ursprungsstrukturen zuordnet: (a) Calcium ist an die äußere Oberfläche der Plasmamembran gebunden. (b) Calcium-Ionen finden sich im Zytoplasma und werden daraus unter Energieverbrauch in den Extrazellulärraum gepumpt, vielleicht durch o. g. Ca^{++} -ATPase. (c) Calcium ist außerdem in intrazellulären Depots gebunden, z. B. am endoplasmatischen Retikulum und/oder der Plasmamembran.
- d) Eine Zellstruktur, die Calcium speichert und ins Zytoplasma abgeben könnte, ist das endoplasmatische Retikulum (28). Mit Hilfe der Calcium spezifischen 'Pyroantimonat-Präzipitationstechnik' wurde ein hochorganisiertes, verbundenes System nachgewiesen, das im Vergleich zum übrigen Intrazellulärraum hohe Mengen Calcium enthält (28). Die auffallende, morphologische Ähnlichkeit dieser Fettzellorganelle mit dem sarkoplasmatischen Retikulum der Muskelzelle, das Calcium-Ionen abgibt und dadurch die Muskelkontraktion auslöst, veranlaßte HALES et. al. (28) zu dem Schluß, daß beide Strukturen auch funktionell ähnliche Aufgaben erfüllen könnten.
- e) Werden isolierte Fettzellen mit radioaktiv markierten Calcium-Ionen gesättigt und Adrenalin appliziert, bewirkt das Katecholamin einen verstärkten Calcium-Efflux aus dem Intrazellulärraum (42); Insulin und Procain hemmen diesen parallel zur antilipolytischen Wirkung. Nach KISSEBAH et. al. (42) ist dies ein zur Erhöhung der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration führender Vorgang, der in ursächlichem Zusammenhang zur Lipolysehemmung durch beide Substanzen steht.
- f) Insulin und Procain vermindern die Calcium-Bindung an mit diesem Kation gesättigten Fettzell-Ghost-Membranen parallel zur Lipolysehemmung (42). Auch an Membranmodellen hemmen Lokalanästhetika (3) und Insulin (40) die Bindung dieses Kations. Vorausgesetzt die Flußrichtung ist in die Zelle, werden die Calcium-Ionen durch Insulin ins Zytoplasma abgegeben.

Abbildung 8.2.

Modell des intrazellulären Antagonismus zwischen cAMP und Calcium-Ionen in der Fettzelle



Alle hier erwähnten Daten unterstützen die o. g. Theorie, daß ein zytosolischer Calcium-Anstieg der zentrale Mechanismus der Insulinwirkung ist. Das Kation wäre der 'second messenger' zwischen der Insulin-Rezeptor-Interaktion und dem metabolischen Effekt, d. h. der Lipolysehemmung (Abbildung 8.2.). Ob dieses Modell tatsächlich zutrifft, ist im Augenblick noch nicht vollständig bewiesen.

8.10. Hypothese: cAMP und Calcium gemeinsam als 'second messenger' der Lipolyseregulation

RASMUSSEN (56) entwickelte ein universelles Modell der intrazellulären Informationsübertragung. Danach gibt es in verschiedenen Geweben mit unterschiedlichen Funktionen einen einheitlichen Mechanismus zwischen einem Stimulus an der Zellmembran, z. B. einem Hormon einerseits und der Zellantwort, z. B. einem metabolischen Effekt andererseits. Seine antagonistischen Vermittler sind Calcium und das zyklische Nucleotid. Beispiele stellen das Herz und die Leber dar (56).

Werden auf die allgemein formulierte Theorie einige Ergebnisse dieser Arbeit, die in der Diskussion daraus gezogenen Folgerungen und aus der Literatur bekannte Daten übertragen, entsteht das in Abbildung 8.2. entworfene Modell der intrazellulären Informationsübertragung für die Fettzelle. Danach ruft die Reaktion eines lipolytischen Hormons mit seinem an der Plasmamembranoberfläche gelegenen Rezeptor über die Aktivierung der Adenylatzyklase einen Anstieg der cAMP-Spiegel hervor. Dies stimuliert die Proteinkinase, die die Triglyceridlipase verstärkt aktiviert. Die dazu antagonistische Insulinwirkung wird durch Calcium-Ionen als 'second messenger' vermittelt. Insulin erhöht als Folge der Hormon-Rezeptor-Interaktion die zytosolische Calcium-Konzentration durch Freisetzung von Ionen aus der Zellmembran und dem endoplasmatischen Retikulum. Die Calcium-Ionen wirken der Aktivierung der Proteinkinase durch cAMP bzw. das lipolytische Hormon entgegen und aktivieren die Phosphatase(n). Daraus resultiert ein der Wirkung lipolytischer Hormone entgegengesetzter Effekt auf die Lipaseaktivität. Gleichzeitig führt der Insulin induzierte Anstieg der zytosolischen Calcium-Konzentration zur Hemmung der Adenylatzyklase und/oder Stimulation der Phosphodiesterase, woraus sich der cAMP senkende Insulineffekt erklären

läßt.

Zweifellos gibt es in dieser Arbeit viele Hinweise für die Relevanz dieser Theorie. Wichtige Gegenargumente sind jedoch die Kompartimentierung des zyklischen Nucleotids (Kapitel 8.1.) sowie die wahrscheinlich ursächliche Beziehung zwischen Adenylatzyklase- und Lipolysehemmung, die cAMP als 'second messenger' einbezieht (Kapitel 8.2.).

9. Zusammenfassung

cAMP-Spiegel und Lipolyse isolierter Fettzellen der Ratte wurden in Abhängigkeit verschiedener Hormone und Substanzen gemessen. Ferner wurde die Lokalanaesthetikawirkung auf die in Membranpräparationen enthaltene Adenylatzyklase untersucht.

Katecholamine stimulieren cAMP-Spiegel und Lipolyserate; Insulinapplikation erniedrigt beide Parameter. Die Wirkung beider Hormone ist von extrazellulären Calcium-Ionen unabhängig. Die Höhe der cAMP-Spiegel korreliert nicht mit der Lipolyserate. Adenosin und die Zellkonzentration im Inkubationsmedium beeinflussen die Höhe der cAMP-Spiegel; Adenosin verhindert als Feedback-Inhibitor eine überschießende cAMP-Bildung und somit einen unnötigen ATP-Verbrauch.

Lokalanaesthetika (Tetracain $10^{-3}M$) hemmen die Katecholamin- und dBcAMP-stimulierte Lipolyse bei gleichzeitiger Erhöhung der cAMP-Spiegel, auch in Gegenwart von IBMX. Auch die Lokalanaesthetikawirkung ist von extrazellulären Calcium-Ionen unabhängig. In weitgehender Übereinstimmung mit Insulin (17) erniedrigt Tetracain die durch Katecholamine stimulierte Adenylatzyklase von Fettzellmembranpräparationen.

Zur Insulinwirkung auf die Lipolyse ist zusammenfassend folgendes zu sagen: Nach wie vor ist unklar, ob die antilipolytische Insulinwirkung durch eine cAMP-Erniedrigung oder durch Calcium-Ionen intrazellulär vermittelt wird. Die Hemmung der Adenylatzyklase und der Lipolyse durch Lokalanaesthetika unterstützt die Bedeutung des cAMP als 'second messenger' der Antilipolyse; es ist jedoch sicher, daß nicht das gesamte, sondern nur ein Teil des intrazellulären cAMP das Proteinkinase-Lipase-System hemmt. Andererseits muß die Lokalanaesthetikawirkung auf cAMP und Lipolyse als Argument für eine Vermittlerrolle des Calciums interpretiert werden. Die dafür erforderlichen Kationen werden jedoch nicht aus dem Extrazellulärraum in die Zelle aufgenommen, sondern stammen aus intrazellulären Depots.

10. Literaturverzeichnis

- 1) Avruch, J., Hoelzl-Wallach, D. F.
1971 Biochim. Biophys. Acta 233, S. 334 - 347
- 2) Birnbaumer, L., Pohl, S. L., Rodbell, M.
1969 J. Biol. Chem. 244, S. 3468 - 3476
- 3) Blaustein, M. P., Goldman, D. E.
1966 Science 153, S. 429 - 432
- 4) Brostrom, C. O., Corbin, J. D., King, C. A., Krebs, E. G.
1971 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, S. 2444 - 2447
- 5) Brown, B. L., Albano, J. D. M., Ekins, R. P., Sgherzi, A. M.
1971 Biochem. J. 121, S. 561 - 562
- 6) Butcher, R. W., Baird, C. E., Sutherland, E. W.
1968 J. Biol. Chem. 243, S. 1705 - 1712
- 7) Butcher, R. W., Ho, R. J., Sutherland, E. W., Meng, H. C.,
1965 J. Biol. Chem. 240, S. 4515 - 4523
- 8) Clausen, T., Elbrink, J., Martin, B. R.,
1974 Acta Endocrinol. (Kbh) 77, Suppl. 191, S. 137 - 143
- 9) Corbin, J. D., 1975 Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5,
Academic Press, New York, S. 253
- 10) Corbin J. D., Soderling, T. R., Park, C. R.
1973 J. Biol. Chem. 248, S. 1813 - 1821
- 11) Cuatrecasas, P.,
1974 Membrane Receptors. Annu. Rev. Biochem. 43, S. 169 - 214
- 12) Dietze, G., Hepp, K. D., Mehnert, H.
1972 Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 78, S. 1113 - 1116
- 13) Ebert, R., Schwabe, U.,
1973 Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 278, S. 247 - 259
- 14) Eggstein, M., Kuhlmann, E., 1970
"Methoden der enzymatischen Analyse"
Hrsg.: H. U. Bergmeyer, II. Auflage,
Verlag Chemie Weinheim/BergstraÙe, S. 1765

- 15) Ekins, R. P., Newman, G. B., Riordan, O.
1968 Radioisotopes in Medicine,
Hrsg. Hayes, R. I., Goswitz, F. A., Murphey, B. E. P., S. 91
- 16) Exton, R. J., Robison, G. A., Sutherland, E. W., Park, C. R.
1971 J. Biol. Chem. 246, S. 6166
- 17) Fain, J. N., Butcher, F. R.
1976 J. Cyclic Nucleotide Res. 2, S. 71 - 78
- 18) Fain, J. N., Pointer, R. H., Ward, W. F.
1972 J. Biol. Chem. 247, S. 6866 - 6872
- 19) Fain, J. N., Rosenberg, L., 1972 Diabetes 21,
Supplement 2, S. 414 - 425
- 20) Feinstein, M. B., Paimre, M.
1969 Federation Proceedings 28, S. 1643 - 1648
- 21) Friedmann, N., Rasmussen, H.
1970 Biochim. Biophys. Acta 222, S. 41 - 52
- 22) Gilman, A. G., 1970 Proceedings of the National Academy
of Sciences, U.S.A., 67, S. 305 - 312
- 23) Gilman, A. G.,
1972 Adv. Cyclic Nucleotide Res. 2, S. 9 - 15
- 24) Glieman, S., 1970 Adipose Tissue, Hormon. Metab. Res.
Suppl. 2,
Hrsg. Jeanrenaud, B., Hepp, K. D., S. 116 - 119
- 25) Glieman, J., 1976 J. Biol. Chem. 251, S. 794
- 26) Häring, H. U., 1977, Dissertation mit dem Titel:
Untersuchungen zur Regulation des cAMP-Stoffwechsels in iso-
lierten Fettzellen unter dem Einfluß von Katecholaminen und
Insulin
Ludwig Maximilians-Universität München, S. 42
- 27) Häring, H. U., Renner, R., Hepp, K. D.,
1976 Molecular and Cellular Endocrinology 5, S. 295 - 302
- 28) Hales, C. N., Luzio, J. P., Chandler, J. A., Herman, L.
1974 J. Cell Sci 15, S. 1 - 15
- 29) Hamprecht, B., Schultz, J.,
1973 Febs - Lett. 34, S. 85 - 89

- 30) Harper, H. A., Löffler, G., Petrides, P. E., Weiss, L.,
1975 Physiologische Chemie, Springer Verlag Berlin,
Heidelberg, New York, S. 346
- 31) Hepp, K. D.
1977 Diabetologia 13, S. 177 - 186
- 32) Hepp, K. D., Renner, R., Häring, H. U.
1976 Eukaryotic Cell Function and Growth
Edited by Dumont, J. F., Brown, B. L.,
Marshall, N. J., New York, S. 567 - 576
- 33) Hepp, K. D., Renner, R.,
1972 Febs Letters 20, S. 191 - 194
- 34) Heptner, W., Christ, O.
1967 Diabetologia 3, S. 443 - 448
- 35) Ho, R. J., Sutherland, E. W., 1971 J. Biol. Chem. 246,
S. 6822
- 36) Hope-Gill, H., 1976,
V. Int. Congr. Endocrinology, Hamburg July 18-24
- 37) Huttunen, J. K., Steinberg, D.
1971 Biochim. Biophys. Acta 239, S. 411
- 38) Illiano, G., Tell, G. P. E., Siegel, M. J., Cuatrecasas, P.
1973 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, S. 2443 - 2447
- 39) Jaanus, S. D., Miele, E., Rubin, R. P.
1967 Br. J. Pharmac. Chemother. 31, S. 319 - 330
- 40) Kafka, M. S., Park, C. Y. C.
1969 J. gen. Physiol. 54, S. 134
- 41) Khoo, J. C., Steinberg, D., Thompson, B., Mayer, S. E.
1973 J. Biol. Chem., S. 3823 - 3830
- 42) Kissebah, A. H., Clarke, P., Vydellingum, N.,
Hope-Gill, H., Tulloch, B., Fraser, T. R.
1975 Europ. J. clin. Invest. 5, S. 339 - 349
- 43) Kissebah, A. H., Hope-Gill, H., Vydellingum, N.,
Tulloch, B. R., Clarke, P. V., Fraser, T. R.
1975 The Lancet 18, S. 144 - 147

- 44) Kissebah, A. H., Tulloch, B. R., Vydelingum, N.,
Hope-Gill, H., Clarke, P., Fraser, T. R.
1974 Horm. Metab. Res. 6, S. 357 - 364
- 45) Kissebah, A. H., Vydelingum, N., Tulloch, B. R.,
Hope-Gill, H., Fraser, T. R.
1974 Hormone Metabol. Res. 6, S. 247 - 255
- 46) Kolb, H. J., Renner, R., Hepp, K. D., Weiss, L., Wieland, O. H.
1975 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, S. 248 - 252
- 47) Kwant, W. O., Seeman, P.
1969 Biochim. Biophys. Acta 193, S. 338 - 349
- 48) Lowry, O. H., Rosebrough, A. J., Farr, A. L., Randall, R. J.
1951 J. Biol. Chem. 193, S. 265 - 275
- 49) Loten, E. G., Sneyd, J. G. T.
1970 Biochem. J. 120, S. 187
- 50) Manganiello, V. C., Murad, F., Vaughan, M.
1971 J. Biol. Chem. 246, S. 2195 - 2202
- 51) Mosinger, B., Vaughan, M.,
1967 Biochim. Biophys. Acta 144, S. 556 - 568
- 52) Papahadjopoulos, D., Jacobson, K., Poste, G., Shepherd, G.
1975 Biochim. Biophys. Acta. 394, S. 504 - 519
- 53) Park, C., 1972 Diabetes, Volume 21, Suppl., S. 426 - 427
- 54) Park, C. R., Sneyd, S. G. T., Corbin, J. D.,
Jefferson, K. D., Exton, R. J., 1975,
Proc. Congress Int. Diabetes Fed. 6th ed. Ostman, Milner,
S. 5 - 15
- 55) Raaflaub, J.
1956 Methods of Biochemical Analysis 3, S. 301 - 325
- 56) Rasmussen, H.,
1970 Science, 170, S. 404 - 412
- 57) Renner, R., Kemmler, W., Hepp, K. D.
1974 Eur. J. Biochem. 49, S. 129 - 141
- 58) Renner, R., Kemmler, W., Hepp, K. D.
1974 Eur. J. Biochem. 49, S. 129 - 141

- 59) Ritchie, J. M., Cohen, P. J., 1970
 "The Pharmacological Basis of Therapeutics"
 Editors: Goodman, L. S., Gilman, A.,
 4th ed., Macmillan, New York, S. 371
- 60) Robison, G. A., 1976 Eukaryotic Cell Function and Growth,
 edited by Dumont, J. E., Brown, B. L.,
 Marshall, N. J., New York, S. 337
- 61) Robison, G. A., Butcher, R. W., Sutherland, E. W., 1971,
 cyclic AMP,
 Academic Press New York, S. 285 - 316
- 62) Robison, G. A., Butcher, R. W., Sutherland, E. W.
 1971 cyclic AMP, Academic Press New York, S. 290 - 291
- 63) Rodbell, M., 1964 J. Biol. Chemistry 239, S. 375 - 380
- 64) Salomon, Y., Londos, C., Rodbell, M.,
 1974 Analytical Biochemistry 58, S. 541 - 548
- 65) Schimmel, R. J.,
 1976 Horm. Metab. Res. 8, S. 195 - 201
- 66) Schwabe, U., Ebert, R., 1972 Naunyn-Schmiedeberg's
 Arch. Pharmacol. 274, S. 287 - 298
- 67) Schwabe, U., Ebert, R., Erbiler, H. C.,
 1973 Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 276,
 S. 133 - 148
- 68) Schwabe, U., Schönhöfer, P. S., Ebert, R.,
 1974 Eur. J. Biochem. 46, S. 537 - 545
- 69) Severson, D. L., Denton, R. M., Bridges, B. J., Randle, P. J.
 1976 Biochem. J. 153, S. 209 - 223
- 70) Siddle, K., Hales, C. N.
 1974 Biochem. J. 142, S. 97 - 103
- 71) Siddle, K., Hales, C. N.,
 1974 Biochem. J. 142, S. 345 - 351
- 72) Steinberg, D., Huttunen, J. K.
 1972 Adv. Cyclic Nucleotide Res. 1, S. 47 - 62

- 73) Steinberg, D., Mayer, E. S., Khoo, J. C., Miller, E. A.,
Fredholm, B., Miller, R. E., Eichner, E.,
1975 Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, S. 549 - 568
- 74) Torres, H. N., Flawia, M. M., Hernaez, L., Cuatrecasas, P.
1978 J. Membrane Biol. 43, S. 1 - 18
- 75) Tovey, K. C., Oldham, K. G. and Whelan, J. A. M.
1974 Clinica Chimica Acta 56, S. 221 - 234
- 76) Vaughan, M., 1972 in "Insulin action"
ed. Fritz, J. B., Academic Press, New York, 297
- 77) Wieser, P. B., Fain, J. N.,
1975 Endocrinology 96, 2, S. 1221 - 1225
- 78) Zinman, B., Hollenberg, C.,
1974 J. Biol. Chem. 249, S. 2182 - 2187

11. Lebenslauf

Geburtsdatum: 18. März 1953

Geburtsort: Kisslegg im Allgäu

Nationalität: Deutscher

Eltern: Franz und Anna Rinninger, geb. Kottmann

Konfession: römisch-katholisch

Schule: 1960 - 1964: Grundschule in Kisslegg
1964 - 1972: Gymnasium in Leutkirch im Allgäu
24. Juni 1972: Reifeprüfung

Wehrdienst: 1972 - 1973: Grundwehrdienst bei der Bundeswehr

Studium: 2. Nov. 1973: Beginn des Humanmedizinstudiums an der Ludwig Maximilians-Universität München

Dissertation: 1976: Beginn vorliegender Arbeit unter Leitung von H. Prof. Dr. K. D. Hepp am Institut für Diabetesforschung, München
Direktion: Prof. Dr. H. Mehnert und Prof. Dr. O. Wieland

Staatsexamen: 21. April 1980

Approbation: 23. April 1980

